

**ZUR KENNTNIS DER
6-METHYLSALICYLSÄURE-SYNTHESE
AUS PENICILLIUM PATULUM**

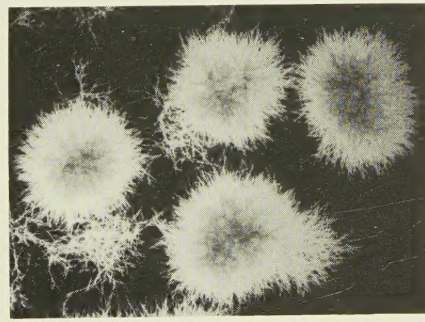
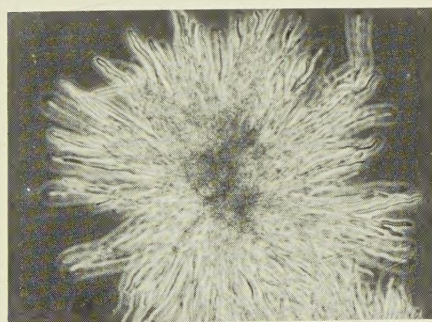
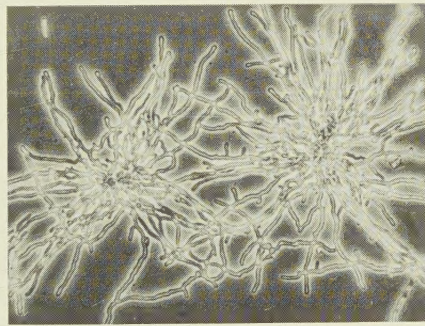
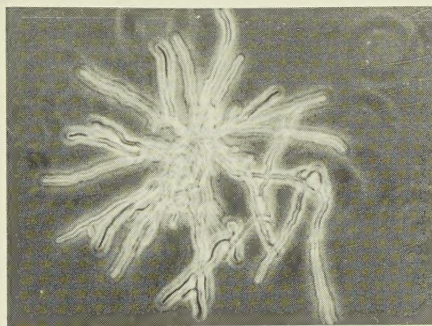
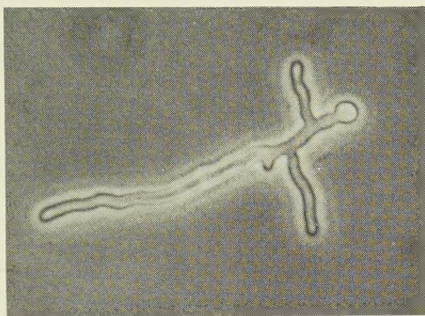
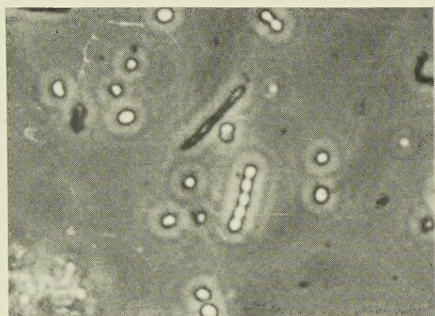
Josef Friedrich

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0015



Verschiedene Wachstumsstadien des Schimmelpilzes
Penicillium patulum.

ZUR KENNTNIS DER
6-METHYLSALICYLSÄURE-SYNTHESE
AUS PENICILLIUM PATULUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

vorgelegt von
Josef Friedrich

München 1977



1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 1. 78

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1974 bis Juli 1977 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Fräulein E. Ringelmann bin ich für ihre Mitarbeit seit Mai 1974 zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. H. Prieß danke ich für die Durchführung und die Diskussion der Versuche mit der Ultrazentrifuge.

Herrn Wunderl danke ich für die Hilfe bei der Züchtung der Mikroorganismen.

Mein Dank gilt ferner Herrn H. Heumann für die Beratung und die Hilfe bei den fluorimetrischen Versuchen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung von Professor Lynen, Max-Planck-Institut für Biochemie, danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit und für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Kultivierung von <i>P. patulum</i> , Stabilisierung und Isolierung der 6-MSS-Synthetase	7
1. Vorbemerkung	7
2. Aufzucht von <i>P. patulum</i>	7
3. Stabilisierung der 6-MSS-Synthetase im zellfreien Extrakt	10
a) Einfluß von proteolytischen Aktivitäten auf die Stabilität	11
b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Stabilität	12
c) Abhängigkeit der Stabilität vom Puffersystem und von der Ionenstärke	12
d) Temperaturstabilität	15
e) Einfluß verschiedener Zusätze auf die Stabilität	15
f) Zusammenfassung	16
4. Isolierung der 6-MSS-Synthetase	18
a) Herstellen eines zellfreien Extraktes	18
b) Fraktionierung mit Polyäthylenglykol 6 000	18
c) Fraktionierung mit Ammoniumsulfat	19
d) Chromatographie an Hydroxylapatit	20
e) Zentrifugation im diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten	21
f) Hydrophobe Chromatographie an 4-Aminobutyryl-Sepharose 4 B	22
5. Reinheitskriterien	24
a) Untersuchung auf Fremdaktivitäten	24
b) Untersuchungen zur Proteineinheitlichkeit	24

	Seite
III. Physikalisch-chemische Eigenschaften	28
1. Untersuchungen zum Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase	28
a) Bestimmung des Molekulargewichts aus der Sedimentationskonstanten	28
α) Sedimentationskonstante der 6-MSS-Synthetase	28
β) Einfluß des pH-Wertes auf die Sedimentationskonstante	31
b) Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts	35
c) Molekulargewichtsbestimmung nach der Methode der Gelpermeationschromatographie	37
d) Bestimmung nach der Methode von Martin und Ames	38
2. Die Untereinheiten der 6-MSS-Synthetase	41
a) Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten	41
b) Zur Identität der Untereinheiten	44
c) Zur Stöchiometrie der Untereinheiten im Multienzymkomplex	47
3. Elektrophoretische Untersuchungen	49
a) Verhalten der 6-MSS-Synthetase in der Disk-Elektrophorese	49
b) Disk-Elektrophoresen bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen	51
4. Bestimmung der Zahl von Bindungsstellen für Acetyl-CoA und Malonyl-CoA	53

	Seite
IV. Reaktive und nicht-reaktive Thiolgruppen der 6-MSS-Synthetase	58
1. Anzahl der Thiolgruppen im Multienzymkomplex	58
2. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid	60
a) Kinetik der Inaktivierung	61
b) Hemmbarkeit der Teilaktivitäten durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid	63
c) Einfluß von Substraten auf die Inaktivierung	64
d) pH-Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwin- digkeit	66
e) Anzahl der durch Jodacetamid modifizier- baren Thiolgruppen	68
3. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch weitere Hemmstoffe	69
V. Dissoziation des Multienzymkomplexes mit Lithium- chlorid und Rekonstitution zum aktiven Enzym	74
1. Vorbemerkung	74
2. Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung	74
3. Dissoziation und Rekonstitution des Multi- enzymkomplexes	81
4. Einfluß verschiedener Parameter auf die Inak- tivierung und die Reaktivierung	84

	Seite
VI. Immunologische Charakterisierung der 6-MSS-Synthetase	91
1. Gewinnung und Anreicherung von Anti-6-MSS-Synthetase	91
2. Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung der 6-MSS-Synthetase und der FS-Synthetase	91
3. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch spezifische Antikörper	94
VII. Zur Bestimmung der Enzymaktivität	101
1. Fluorimetrische Bestimmung der 6-Methylsalicylsäure	101
2. Einfluß der Substrate auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase	110
3. Zur Bestimmung der Dehydratase-Aktivität	114
VIII. Experimentelle Einzelheiten	117
1. Verwendete Geräte	117
2. Reagenzien	118
3. Synthese von Substraten	119
4. Analytische Methoden	119
5. Zu Kapitel II	120
a) Kultivieren von <i>P. patulum</i>	120
α) Schrägagarkultur	120
β) Submerse Züchtung von <i>P. patulum</i>	120
γ) 6-MSS-Synthetase-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstum	122

	Seite
b) Reinigung der 6-MSS-Synthetase	122
6. Zu Kapitel III	126
a) Analytische Ultrazentrifugation	126
b) Gelpermeationschromatographie	127
c) Zentrifugation im Rohrzuckergradienten	127
d) Diskelektrophorese	127
e) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	128
f) Citraconylierung und Carboxymethylierung der 6-MSS-Synthetase	129
g) Verbrücken der 6-MSS-Synthetase mit bi- funktionellen Imidoestern	129
7. Zu Kapitel IV	130
a) Inhibierung der 6-MSS-Synthetase mit Hemmstoffen	130
b) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert	130
8. Zu Kapitel V	131
a) Dissoziation der 6-MSS-Synthetase	131
b) Rekonstitution gespaltener 6-MSS-Synthetase	131
9. Zu Kapitel VI	131
a) Gewinnung der Antiseren	131
b) Anreicherung der γ -Globuline	132
c) Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	132
d) Immuno-Elektrophorese	133
e) Gesamtaktivität und Teilaktivitäten der 6-MSS-Synthetase in Gegenwart von Anti- 6-MSS-Synthetase	133

	Seite
10. Zu Kapitel VII.	133
a) Gesamtaktivität der 6-MSS-Synthetase	133
α) Optischer Standard-Enzymtest	133
β) Fluorimetrischer Standard-Enzymtest ohne NADPH-regenerierendes System	134
γ) Fluorimetrischer Standard-Enzymtest mit einem NADPH-regenerierendem System	134
b) Bestimmung der Teilaktivitäten	135
α) Acetyl-Transferase (optischer Test)	135
β) Malonyl-Transferase (optischer Test)	135
γ) Malonyl-Transferase (radioaktiver Test)	135
δ) Triacetsäurelaktone-Bildung (optischer Test)	136
ϵ) Triacetsäurelaktone-Bildung (radioaktiver Test)	136
ζ) β -Ketoacylreduktase	137
η) Dehydratase	137
c) Bestimmung anderer enzymatischer Aktivitäten	137
α) Fettsäuresynthetase (Hefe)	137
β) Fettsäuresynthetase (P. patulum)	138
γ) 6-MSS-Decarboxylase (P. patulum)	138
IX. Zusammenfassung der Ergebnisse	140
X. Literaturverzeichnis	144
Lebenslauf	

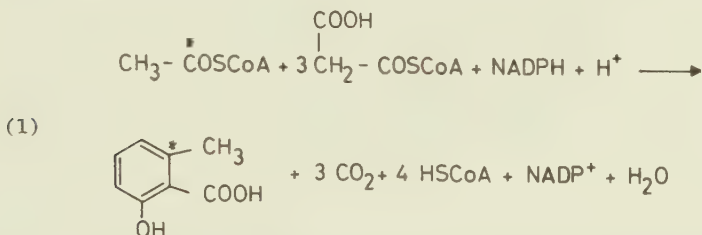
Verwendete Abkürzungen

^{14}C	Kohlenstoffisotop 14
Cl	Curie
CoA, CoASH	Coenzym A
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E, mE	Enzymeinheit, -millieinheit
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FS	Fettsäure(n)
IAM	Jodacetamid
Ipm	Impulse pro Minute
k	Geschwindigkeitskonstante
K_m	Michaelis-Konstante
min	Minute
6-MSS	6-Methylsalicylsäure
MG	Molekulargewicht
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduziert
NEM	N-Äthylmaleinimid
P.	Penicillium
PEG	Polyäthylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
O.D.	Optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volumen, Volt
Anti-6-MSS-Synthetase	über DEAE-Cellulose gereinigte Antikörperfraktion aus spezifischen Anti-6-MSS-Synthetase-Seren.

I. EINLEITUNG

Die Bildung der 6-Methylsalicylsäure (6-MSS) stellt im sekundären Stoffwechsel des Schimmelpilzes *P. patulum* den ersten Schritt in der Biosynthese von Patulin dar (1,2).

Biogenetisch zählt die 6-MSS zu den Polyketiden, deren Synthese der Polyacetatregel gehorcht. Diese besagt, daß wiederholt C_2 -Einheiten aus Malonyl-CoA durch Kopf-Schwanz-Kondensation an ein Startermolekül Acetyl-CoA angelagert werden. Isotopenversuche mit 1- ^{14}C -Acetyl-CoA bzw. 2- ^{14}C -Malonyl-CoA bestätigten die Gültigkeit dieser Regel für die Synthese der 6-MSS (3-5) und führten zur Aufstellung folgender Reaktionsgleichung:



Die enzymatische Synthese läuft über mehrere hintereinandergeschaltete Teilschritte, für die eigene katalytische Aktivitäten angenommen werden und deren Aufeinanderfolge nach einem Vorschlag von Lynen in Abb. 1 dargestellt ist (5-7). Es gelang jedoch nicht, die hypothetischen Zwischenprodukte nachzuweisen oder die entsprechenden Teilaktivitäten zu isolieren. Möglich war allein die Anreicherung des gesamten 6-MSS-synthetisierenden Systems. Aus diesem Befund mußte geschlossen werden, daß alle notwendigen Teilschritte der 6-MSS-Synthese von einem Multienzymkomplex, der 6-Methylsalicylsäure-Synthetase, katalysiert werden.

weglich die Funktion eines Substratcarriers erfüllen kann. Die periphere SH-Gruppe, wahrscheinlich ein Cysteinrest, ist dagegen im Komplex lokalisiert.

Die Synthese der 6-MSS wird durch die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-CoA über die zentrale auf die periphere SH-Gruppe gestartet. Ihr folgt die Übertragung eines Malonylrestes von Malonyl-CoA auf die zentrale Thiolgruppe. Unter Decarboxylierung kondensieren die beiden Acylreste. Dadurch wird die zentrale SH-Gruppe frei, die einen neuen Malonylrest übernehmen kann. Erst nach der zweiten Kondensation unter Bildung eines enzymgebundenen Triacetsäurethioesters wird die mittlere Carbonylgruppe reduziert (7,9). Ob die Dehydratisierung auf dieser Stufe und/oder nach Kondensation des dritten Malonylrestes erfolgt, konnte bisher nicht entschieden werden. Hypothetisch sind auch die Vorstellungen über die Zyklisierung der C₈-Kette, sowie die Hydrolyse der 6-MSS vom Multienzymkomplex.

Von den erforderlichen Teilaktivitäten konnten bisher die Acetyl-Transferase (10,11), die Malonyl-Transferase (11) und die Reduktase (9) mit Hilfe von Modellsubstraten nachgewiesen werden. Die kondensierende Teilaktivität war mit einem Test nur indirekt über die Bildung von Triacetsäurelaktolon meßbar, die jedoch eine intakte Acetyl- und Malonyl-Transferase voraussetzt (7).

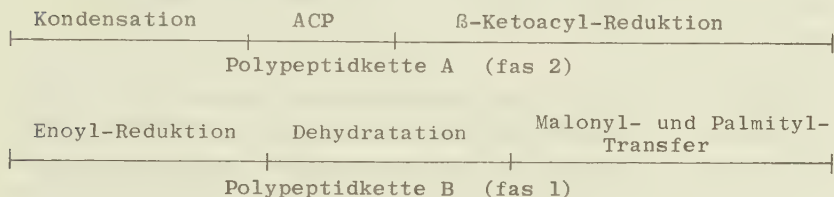
Die im Münchner Laboratorium durchgeführten Versuche zur Biosynthese von Fettsäuren, die ebenfalls nach der Polyacetatregel an einem stabilen Multienzymkomplex aufgebaut werden, ergaben trotz der chemischen Unterschiede einige auffallende Ähnlichkeiten zur Synthese der 6-MSS. Die aromatischen und die langkettigen Säuren werden nach gleichen Prinzipien aus den gleichen Grundbausteinen aufgebaut. Entsprechend sollten beide Synthetasen auch gleiche oder miteinander vergleichbare Teilaktivitäten aufweisen, was z.B. die Synthese des von bei-

den Synthetasen aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA bei NADPH-Mangel katalysierten Triacetsäurelaktons beweist. Der Verdacht lag nahe, daß in *P.patulum* für die Synthese der Acetogenine 6-MSS und Fettsäuren nicht zwei verschiedene Enzymsysteme notwendig sind, sondern das Fettsäuren synthetisierende System unter bestimmten Bedingungen auch die Bildung des für nicht lebensnotwendig gehaltenen Nebenproduktes 6-MSS katalysieren kann.

Tatsächlich gelang es Dimroth (6,7), die 6-MSS- und die FS-Synthetase aus *P.patulum* zu trennen und damit zu zeigen, daß die 6-MSS-Synthetase nur 6-MSS, nicht aber Fettsäuren bildet und vice versa die FS-Synthetase keine 6-MSS-, wohl aber Fettsäuren-Synthese ermöglicht.

Aufgrund der in beiden Multienzymkomplexen vorkommenden Enzymaktivitäten wäre zu erwarten, daß diese untereinander austauschbar sind, wie dies bei anderen Enzymsystemen z.B. der Leber- und Muskel-Glykogen-Phosphorylase (12), der RNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus* und *Escherichia coli* (13) und teilweise auch bei der Citrat- und Citramalat-Lyase aus *Klebsiella aerogenes* und *Clostridium tetanomorphum* (14) gelungen ist. Analoge Hybridisierungsexperimente mit 6-MSS-Synthetase aus *P.patulum* und der gut untersuchten Hefe-FS-Synthetase würden einen besseren Einblick in die Funktion, Struktur und Phylogenie der 6-MSS-Synthetase ermöglichen. Die Arbeiten von Schweizer (15-21) an der Hefe-FS-Synthetase zeigen jedoch, daß eine Hybridbildung - sofern sie überhaupt möglich ist - gewissen Einschränkungen unterworfen ist. Die Untersuchungen mit Fettsäurenmangelmutanten von Hefe ergaben, daß der Multienzymkomplex durch nur zwei verschiedene Genloci codiert wird, deren Genprodukte zwei nicht-identische Polypeptidketten sind, was auch die Elektrophorese SDS-gespaltener FS-Synthetase bewiesen hat (22). Demnach müssen einer Polypeptidkette mehr als eine Teilaktivität zugeordnet werden. Nach Schweizer (23) sind die Teil-

aktivitäten nach folgendem Schema auf den beiden Polypeptidketten A und B lokalisiert:



Eine derartige Gruppenbildung schränkt die freie Austauschbarkeit von Teilenzymen insoweit ein, daß nur ganze Enzymgruppen ersetzt bzw. ausgetauscht werden können, ein in der Genetik schon seit langer Zeit bekannter Vorgang.

Daß aber der Aufbau der Hefe-FS-Synthetase aus zwei nicht-identischen, multifunktionalen Polypeptidketten nicht die Regel ist, zeigt die FS-Synthetase aus *Escherichia coli*, die sich aus sechs verschiedenen, monofunktionalen Enzymen und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) zusammensetzt (24-26). Ähnliches wurde auch bei anderen Enzymsystemen beobachtet. Zum Beispiel sind bei der Acetyl-CoA-Carboxylase aus *Escherichia coli* die drei Teilaktivitäten auf verschiedenen Proteinen lokalisiert (27,28), während sie beim Hefe-Enzym auf einer Polypeptidkette liegen (29). Offensichtlich können im Verlauf der Evolution benachbarte Gene zu größeren Funktionseinheiten verschmelzen. Bei der Entwicklung multifunktionaler Enzymsysteme wirken sicherlich die Vereinfachung der Stöchiometrie und die damit verbundene erhöhte Sicherheit bei der Synthese derartiger komplexer Systeme selektionspositiv. Hinzukommen mag wohl auch ein wirksamer Schutz gegen den Angriff unspezifischer Exopeptidasen.

Ungelöst ist die Frage, ob die 6-MSS-Synthetase aus monofunktionellen Polypeptidketten aufgebaut ist, oder ob wie bei der Hefe-FS-Synthetase multifunktionelle Polypeptidketten vorliegen.

Zunächst mußten die für die Lösung dieser zentralen Frage notwendigen Voraussetzungen geschaffen werden:

1. Die Entwicklung eines reproduzierbaren Reinigungsverfahrens mit zufriedenstellenden Ausbeuten und
2. die Ausarbeitung einer hochspezifischen Enzymbestimmungsmethode, die eine schnelle und sichere Bestimmung der 6-MSS-Synthetase-Aktivität erlaubt.

Um einen Einblick in die Struktur des Multienzymkomplexes zu erhalten, war ferner die Untersuchung von einigen wesentlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften notwendig. Es sollten geeignete Bedingungen gefunden werden, die eine reversible Dissoziation des Multienzymkomplexes gestatten.

Eine immunologische Charakterisierung der 6-MSS-Synthetase sollte außerdem zur Aufklärung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen 6-MSS-Synthetase und Hefe-FS-Synthetase beitragen.

II. KULTIVIERUNG VON P. PATULUM, STABILISIERUNG UND ISOLIERUNG DER 6-MSS-SYNTHETASE

1. Vorbemerkung

Für die 6-MSS-Synthetase wurde von Dimroth (6,7) ein Reinigungsverfahren ausgearbeitet, mit dem der Multienzymkomplex gegenüber dem Rohextrakt etwa 100-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 130 mE/mg angereichert werden kann. Für eine Reinigung im größeren Maßstab ist dieses Verfahren jedoch nicht geeignet.

Vogel (30) beschrieb eine Isolierungsvorschrift, nach der die 6-MSS-Synthetase 110-fach angereichert und eine spezifische Aktivität von 206 mE/mg erzielt werden konnte. Mit dem Standardansatz erhielt Vogel ca. 92 mg 6-MSS-Synthetase. Das Enzympräparat war stabil, frei von FS-Synthetase-Aktivität und verhielt sich in der Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation (31), in der Cellogel-Elektrophorese, im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest und in der Immunoelektrophorese (30) einheitlich. Da dieses Reinigungsverfahren nicht reproduzierbar war, mußte durch Abänderungen bzw. Einführung von Reinigungsschritten ein neues Isolierungsschema für die 6-MSS-Synthetase ausgearbeitet werden.

2. Aufzucht von P.patulum

Zur Kultivierung des Schimmelpilzes P.patulum entwickelte Dimroth (6) ein zweistufiges, submerses Fermentationsverfahren:

Stufe 1: Aufzucht des Mycels in Schüttelkulturen

Stufe 2: Züchtung des Mycels in Fermentoren mit
10 l Kulturmedium.

Mit diesem Verfahren erhält man nach einer Fermentationszeit von insgesamt 60 Stunden ein Mycel, dessen zellfreier Extrakt

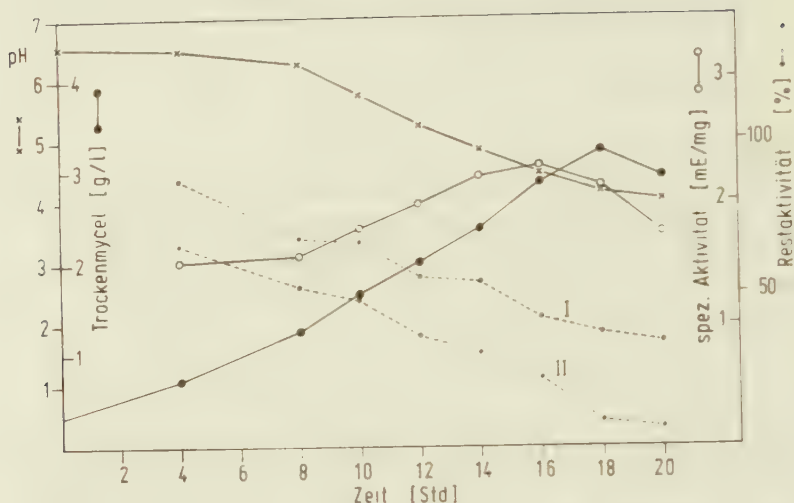


Abb. 2 Abhängigkeit der 6-MSS-Synthetase-Aktivität von der Dauer des Wachstums einer Kultur in einem 240-Liter-Fermentor. Die Wachstumsbedingungen, die Trockengewichtsbestimmung und das Herstellen der zellfreien Extrakte werden in Abschnitt VIII.5.a) beschrieben. Zur Bestimmung der Stabilität (---) wurden die Enzymaktivitäten 4 bzw. 6 Stunden (Kurve I bzw. II) nach Herstellen der zellfreien Extrakte gemessen.

6-MSS-Synthetase-Aktivität zeigt. Obwohl die von Dimroth angegebenen Züchtungsbedingungen genau eingehalten wurden und das Medium für jeweils 6 Fermentoren identisch war, mußten starke Schwankungen in der Enzymaktivität und Enzymstabilität hingenommen werden. Es gelang uns nicht, das Wachstum des Schimmelpilzes in verschiedenen Fermentoren zu synchronisieren, um ein einheitliches, 6-MSS-Synthetase-aktives Zellmaterial zu erhalten.

Die Erweiterung des Zuchtverfahrens von *P. patulum* um eine zusätzliche Stufe führte zu größeren Mengen Mycel mit konstant hoher 6-MSS-Synthetase-Aktivität und -Stabilität und mit minimaler Proteinheterogenität im zellfreien Extrakt.

Stufe 3: Züchtung des Mycels in einem Fermentor mit 240 l Kulturmedium.

Als Inokulum für den Fermentor mit 200 l Medium diente der Inhalt von vier 10-Liter-Fermentoren, in denen der Schimmelpilz bereits 24 Stunden gewachsen war. Temperierung und Belüftung der Kultur, sowie Rührgeschwindigkeit und Antischaummittel-Zusatz wurden unverändert von Stufe 2 der Kultivierung auf Stufe 3 übertragen.

Der Wachstumsverlauf einer Schimmelpilzkultur im Großfermentor (Abb. 2) zeigt, daß das exponentielle Wachstum ohne lag-Phase fortgesetzt wird. Bereits nach 18 bis 20 Stunden erreicht der Pilz die stationäre Wachstumsphase. Die von Anfang an hohe spezifische Aktivität der 6-MSS-Synthetase nimmt während des Wachstums stetig zu, begleitet aber von einer entsprechenden Abnahme der 6-MSS-Synthetase-Stabilität. Dieser Effekt kann damit erklärt werden, daß bei Mikroorganismen erst am Ende des logarithmischen Wachstums ein intensiver Proteinumsatz nachweisbar ist, der größere, proteolytische Kapazitäten voraussetzt (32). Diese könnten möglicherweise für die zunehmende Instabilität des Multienzymkomplexes mitverantwortlich gemacht werden. Denkbar ist aber auch, daß sich in den Zellen Sekundärmetabolite anhäufen, die u.a. auch die 6-MSS-Synthetase inaktivieren, wie dies für Patulin gezeigt werden konnte (Abschnitt V.3.). Da das Ernten und Lyophilisieren des Mycels, sowie die ersten Schritte der Enzymanreicherung zeitaufwendig sind, war es naheliegend, den Zeitpunkt des Erntens so zu wählen, daß Mycelmenge, Enzymaktivität und -stabilität zueinander in einem optimalen Verhältnis standen. Als brauchbarer und leicht zu bestimmender Parameter erwies sich der pH-Wert des Mediums. Wir erhielten aus einem bei pH 4.7 bis 5.5 geernteten Fermentor 2.5 bis 3.0 kg Feuchtmycel mit einer spezifischen Aktivität von 1.5 bis 2.0 mE/mg und einer ausreichenden Stabilität.

Die gut gewaschenen Zellen ließen sich ohne große Aktivitätsverluste lyophilisieren. Das Lyophilisat konnte bei -32°C unbegrenzt gelagert werden (30).

3. Stabilisierung der 6-MSS-Synthetase im zellfreien Extrakt

Die 6-MSS-Synthetase zeigt im zellfreien Extrakt in der Regel eine für Enzyme ungewöhnlich geringe Stabilität. Häufig verliert sie bei Aufbewahrung im Eisbad in zwei Stunden etwa die Hälfte der Aktivität (Abb. 3). Dies hinderte Light (33,34) daran, den Multienzymkomplex anzureichern. Mit einer Acetonbehandlung des Rohextraktes gelang es Dimroth (6,7), die 6-MSS-Synthetase zu konservieren und ausreichend zu stabi-

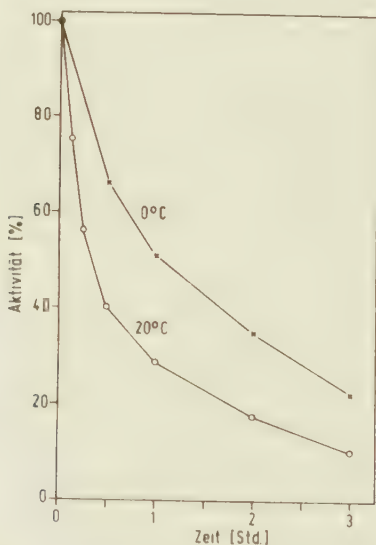


Abb. 3 Stabilität der 6-MSS-Synthetase im zellfreien Extrakt (0.2 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, 5 mM β -Mercaptoäthanol und 5 mM EDTA).

lisieren, so daß die Möglichkeit zu einer Reinigung des Multi-enzymkomplexes gegeben war. Für uns stellte sich erneut das Problem, Bedingungen zu finden, unter denen hohe Aktivitätsverluste während der Aufarbeitung vermieden werden konnten.

a) Einfluß von proteolytischen Aktivitäten auf die Stabilität

Als erstes sollte geklärt werden, ob die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase auf proteolytische Aktivitäten oder nicht-proteolytische Komponenten im Rohextrakt zurückzuführen ist. Dazu wurde ein Aliquot eines zellfreien Extraktes 30 Minuten aufgekocht und sowohl zellfreier Extrakt als auch zentrifugierter Kochsaft bei 30° C mit gereinigter 6-MSS-Synthetase

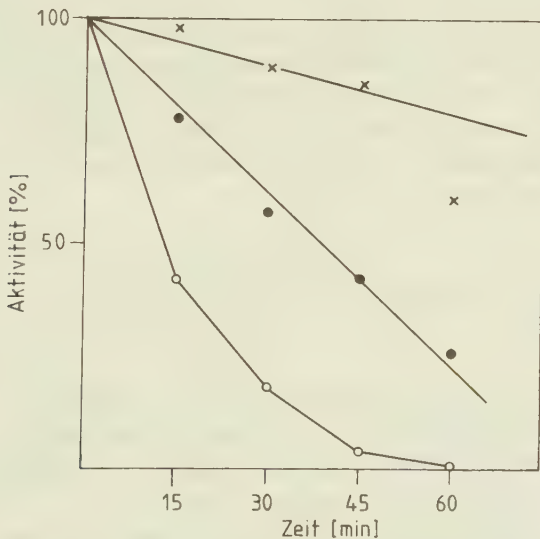


Abb. 4 Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Rohextrakt bzw. Kochsaft (30 Minuten bei ca. 100° C) bei 30° C. In 0.5 ml Rohextrakt (o-o-o), 0.5 ml Kochsaft (●-●-●) und 0.5 ml 0.2 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8 (x-x-x) wurden 510 mE 6-MSS-Synthetase inkubiert.

inkubiert. Die Aktivitätsbestimmungen zu verschiedenen Zeiten zeigen, daß nicht nur proteolytische Enzyme für die Instabilität der 6-MSS-Synthetase verantwortlich sind (Abb. 4). Der Mangel an spezifischen Modells substraten für die 6-MSS-Synthetase-Inaktivase(n) hinderte uns, diese näher zu charakterisieren. Wir beschränkten uns darauf, ihren Einfluß durch Arbeiten bei niedrigen Temperaturen zu schwächen. Da uns eine Analyse des Kochsaftes nicht sehr sinnvoll erschien, versuchten wir der Inaktivierung durch nicht-proteolytische Komponenten dadurch zu begegnen, daß wir nach optimalen Milieubedingungen und nach stabilisierenden Zusätzen verschiedener Art suchten.

b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Stabilität

Einheitliche und etwa 16-fach angereicherte 6-MSS-Synthetase wurde in Puffern mit verschiedenen pH-Werten bei 4° C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten die Restaktivität bestimmt (Abb. 5 und 6). Das Ergebnis dieses Versuches zeigt die extreme Säurelabilität der 6-MSS-Synthetase und die hohe Stabilität bis pH 10.5.

c) Abhängigkeit der Stabilität vom Puffersystem und von der Ionenstärke

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurde Mycel mit verschiedenen Puffersystemen, die im Bereich von pH 7.5 bis 8.0 noch ausreichende Pufferkapazität besitzen, aufgeschlossen und dann die Inaktivierung verfolgt (Tab. 1).

Der Einfluß der Ionenstärke wurde mit Phosphat-Puffer, pH 7.8, untersucht. Zwischen 10 mM und 300 mM K-Phosphat konnten wir keine Abhängigkeit der Enzymaktivität beobachten.

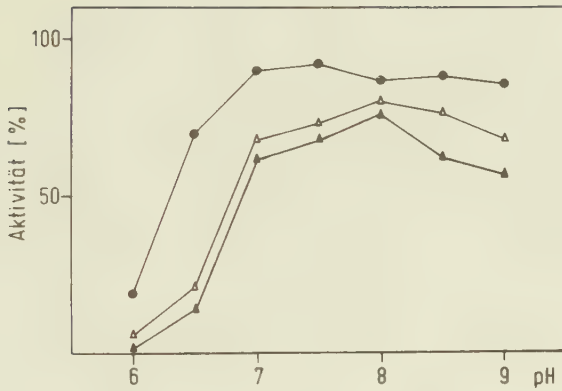


Abb. 5 pH-Stabilität der 6-MSS-Synthetase
Nach Inkubation der Enzymproben (spez. Akt. 36 mE/mg) beim jeweiligen pH-Wert wurde die Enzymaktivität bestimmt. Inkubationsdauer: 30 (●-●-●), 60 (Δ-Δ-Δ) und 120 Minuten (▲-▲-▲). Inkubationspuffer: 0.2 M K-Phosphat, pH 6.0 bis 8.0, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 bis 9.0.

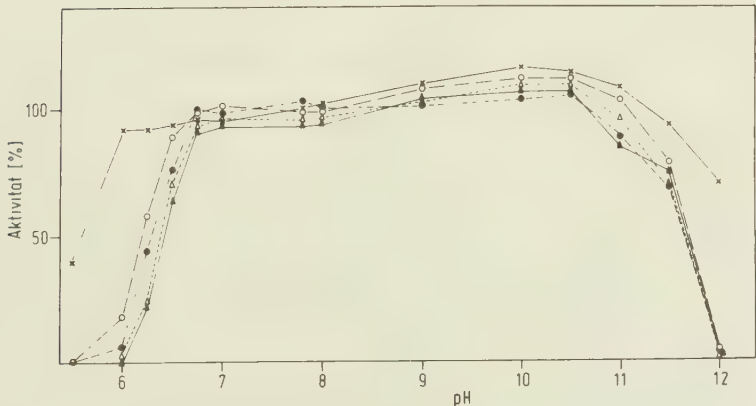


Abb. 6 pH-Stabilität gereinigter 6-MSS-Synthetase
Inkubationsdauer: 0 (x-x-x), 15 (o-o-o), 30 (●-●-●), 60 (Δ-Δ-Δ) und 120 Minuten (▲-▲-▲). Inkubationspuffer: 0.2 M K-Phosphat, pH 6.0 bis 7.8, 0.2 M Tris-Phosphat, pH 7.0 bis 9.0 und 0.2 M Phosphat-NaOH, pH 8.5 bis 12.0.
Als 100 % relative Aktivität wurde die Enzymaktivität in 0.2 M K-Phosphat, pH 7.8, angenommen.

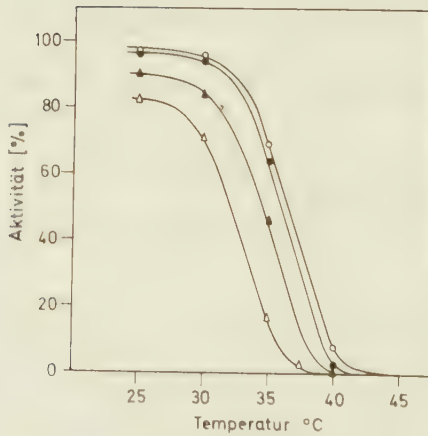
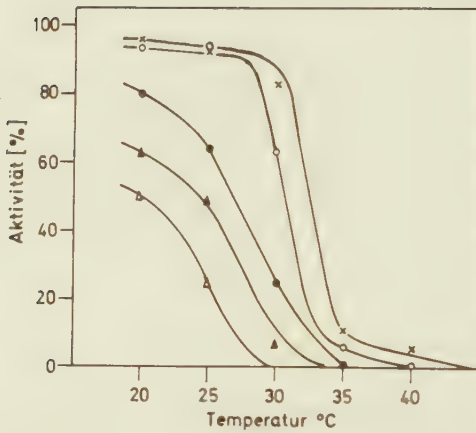


Abb. 7 Thermostabilität der 6-MSS-Synthetase.
Die spezifische Aktivität der untersuchten Enzym-
lösungen betrug 2.4 mE/mg (oberes Bild) und
110 mE/mg (unteres Bild). Die Bestimmung der
Enzymaktivität erfolgte nach 5 (x-x-x), 15 (o-o-o),
30 (●-●-●), 60 (▲-▲-▲) und 120 Minuten (Δ-Δ-Δ).

Tab. 1 Stabilität der mit verschiedenen Puffersystemen hergestellten Rohextrakte.

Puffersystem	pH	Restaktivität nach	
		2 Stunden	4 Stunden
0.1 M K-Phosphat	7.6	55	26
0.1 M Tris-HCl	8.0	58	34
0.1 M Pyrophosphat	7.6	74	53
0.1 M Imidazol	7.6	52	27

d) Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität der 6-MSS-Synthetase wurde sowohl mit einem Rohenzym als auch mit einem proteineinheitlichen Enzympräparat der spezifischen Aktivität von 110 mE/mg untersucht (Abb. 7). Die auf den Zeitpunkt t_0 extrapolierte 50 %-Inaktivierungstemperatur betrug 37° C.

e) Einfluß verschiedener Zusätze auf die Stabilität

Wie Dimroth (6,7) konnten auch wir keinen Einfluß von EDTA (10^{-2} M) und Phenylmethansulfonylfluorid (10^{-3} M) auf die Stabilität der 6-MSS-Synthetase beobachten. Trotzdem wurde der Aufschlußpuffer mit diesen Agenzien versetzt, um störende Schwermetallionen abzufangen und proteolytische Enzyme, sofern es sich um Metall- oder Serinproteasen handelt, zu hemmen. Da am katalytischen Prozeß der 6-MSS-Synthese Thiolgruppen beteiligt sind, mußte immer unter wirksamem Thiol-schutz gearbeitet werden. Rohextrakte, die ohne β -Mercapto-äthanol oder Dithiothreitol hergestellt wurden, enthielten geringe Ausgangsaktivitäten, die nach kurzer Zeit schon unmeßbar klein wurden. Während der ersten Anreicherungsschritte wurden die Puffer mit maximal 5 mM β -Mercaptoäthanol

versetzt. Reinere Enzympräparate wurden mit 1 bis 10 mM Di-thiothreit vor Oxydation geschützt.

Stabilisierend wirkte Serumalbumin (6), Polyäthylenglykol 1500 und 6000 (Tab. 2) und Glycerin (6) (Abb. 8). Mit 4 % Polyäthylenglykol und 10 bis 20 % Glycerin konnte eine deutliche Steigerung der Enzymstabilität erreicht werden. Im Gegensatz zu Glycerin kann Polyäthylenglykol aber nur begrenzt eingesetzt werden, da es z.B. bei Salzfällungen zu einer störenden Phasenbildung kommen kann.

Tab. 2 Stabilisierung der 6-MSS-Synthetase-Aktivität im Rohextrakt durch verschiedene Zusätze.

Zugesetzter Stoff	Restaktivität nach	
	2 Stunden	4 Stunden
keine Zusätze	65	48
PEG 1500 2 %	70	40
PEG 1500 4 %	89	78
PEG 6000 2 %	82	55
PEG 6000 4 %	98	84

f) Zusammenfassung

Aus den Versuchen zur Stabilisierung der 6-MSS-Synthetase ergaben sich für die Ausarbeitung eines Reinigungsschemas mehrere Forderungen:

1. Am Anfang der Reinigung müssen schnelle und leicht zu handhabende Fällungsschritte stehen, mit denen man innerhalb weniger Stunden zu einem stabileren Enzympräparat kommt.
2. Alle Operationen sind bei Temperaturen unterhalb 10° C durchzuführen.

3. Mercaptoäthanol (5 mM) bzw. Dithiothreitol (1 mM) und Glycerin (10 - 20 %) schützen das Enzym wirksam vor Inaktivierung.
4. Für eine Anreicherung eignen sich Phosphat- und Tris-Puffer, deren pH-Wert zwischen 7.5 und 8.0 liegen, da pH-bedingte Inaktivierungen irreversibel sind.

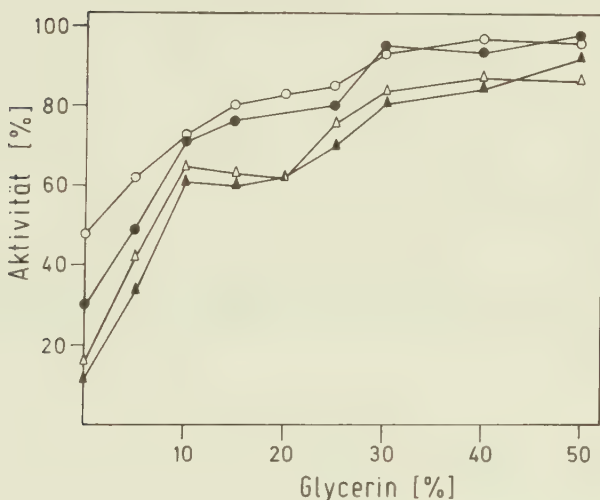


Abb. 8 Abhängigkeit der Stabilität der 6-MSS-Synthetase vom Glyceringehalt im Aufschlußpuffer. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach 2 (○-○-○), 4 (●-●-●), 6 (△-△-△) und nach 8 Stunden (▲-▲-▲).

4. Isolierung der 6-MSS-Synthetase

Für die Reinigung der 6-MSS-Synthetase wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das zum Teil der von Vogel (30) vorgeschlagenen Reinigungsvorschrift entspricht.

a) Herstellen eines zellfreien Rohextraktes

Ausgangsmaterial war lyophilisiertes Mycel, das entweder in einer Kugelmühle bei 4° C langsam staubfein gemahlen und in Aufschlußpuffer (siehe Seite 123) suspendiert oder zuerst in Aufschlußpuffer aufgenommen und dann mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator (98) unter intensivem Kühlen des Schüttelguts aufgeschlossen wurde. Durch kurzzeitiges Abzentrifugieren nicht aufgeschlossener Zellen, der Zellorganellen und der größeren Zellbruchstücke erhält man einen gelblich trüben Überstand, den zellfreien Extrakt.

Ausgehend von 150 g lyophilisiertem Mycel erhält man etwa 3000 ml Rohextrakt mit einer spezifischen Aktivität zwischen 1.2 und 2.5 mE/mg. Der Aktivitätsverlust beträgt bei 4° C in 4 Stunden höchstens 30 %.

b) Fraktionierung mit Polyäthylenglykol 6000

Polyäthylenglykol, ein nicht-ionisches, wasserlösliches Fällungsreagenz, fand bei Enzymisolierungen bisher nur beschränkt Anwendung. Eine allgemein akzeptierte Theorie zur Ausfällung von Proteinen durch nicht-ionische Polymere gibt es nicht. Die Arbeiten von Juckes (35) und Forster (36) zeigen, daß das Ausfällen von Proteinen mit Polyäthylenglykol ebenso wie die Salzfällung von der Temperatur, der Ionenstärke, vom pH-Wert und von der Proteinkonzentration abhängig sind. Deshalb ist die Einhaltung konstanter Bedingungen erforderlich.

Wegen der unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten, von denen man bei Arbeiten mit Rohextrakten stets ausgehen muß, wurde die Fraktionierung mit Polyäthylenglykol 6000 zunächst in sehr weiten Grenzen durchgeführt. Bei der zweiten Fraktionierung, ebenfalls mit Polyäthylenglykol 6000, konnten die Fällungsgrenzen enger gewählt werden.

Die Verwendung von Tris- Puffer erwies sich gegenüber Phosphat-Puffer als vorteilhafter. In Tris-Puffer wird die 6-MSS-Synthetase zwischen 4 und 9 Gew.% PEG 6000 ausgefällt. Wegen der niedrigen Polymerkonzentrationen kann daher die Fällung in wenigen Minuten ausgeführt werden.

c) Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Die 6-MSS-Synthetase fällt mit Ammoniumsulfat zwischen 22 % und 37 % der Sättigung. Die Fällung wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, deren pH-Wert auf 7.8 eingestellt war, durchgeführt. Dies verkürzt die Fällungszeit und erübrigt eine Kontrolle des pH-Wertes.

Bei dieser Folge der Fällungsschritte kann es zuweilen zu einem partiellen oder vollständigen Aktivitätsverlust kommen. Im Verlauf unserer Untersuchungen beobachteten wir, daß bei Erreichen einer Ammoniumsulfatkonzentration von 35 % der Sättigung unvollständig abgetrenntes Polyäthylenglykol eine eigene Phase bildete, die nach dem Zentrifugieren oft nur als hauchdünne Schicht erkennbar auf dem Überstand schwamm. In dieser Phase konnte ein großer Teil der verlorengegangenen Aktivität gefunden werden. Wegen der geringen Reproduzierbarkeit wurde darauf verzichtet, diesen Effekt zur Anreicherung der 6-MSS-Synthetase zu nützen. Um jedoch diese störende Phasenbildung zu unterdrücken, wurde vor dem Aufnehmen des Niederschlags der vorausgegangenen Fällung das restliche Polyäthylenglykol mit Zellstoff entfernt. Mit dieser einfachen Vorsichtsmaßnahme konnte die unerwünschte Phasenbildung weitgehend vermieden werden.

Bei allen durchgeführten Anreicherungen beobachteten wir eine sprunghafte Zunahme der Gesamtaktivität von 130 % bis 150 %. Welche Ursachen diese Aktivierung hat, wurde nicht weiter untersucht.

d) Chromatographie an Hydroxylapatit

Der 6-MSS-Synthetase und der FS-Synthetase sind viele Merkmale gemeinsam, was eine vollständige Trennung beider Synthetasen notwendig macht. Dimroth (6,7) nützte die unterschiedlichen Molekulargewichte beider Enzyme aus, womit die erwünschte Trennung bei entsprechender Sorgfalt zu erreichen war. Vogel (30) gelang die sichere und vollständige Trennung der beiden Multienzymkomplexe durch Chromatographie an Hydroxylapatit. Wir übernahmen diesen Schritt mit zwei Modifikationen:

1. Die Verwendung von Glycerin-haltigen Puffern steigerte erheblich die Aktivitätsausbeute. Ohne Glycerin in den Elutionspuffern war eine Chromatographie stets mit sehr hohen Aktivitätsverlusten verbunden.

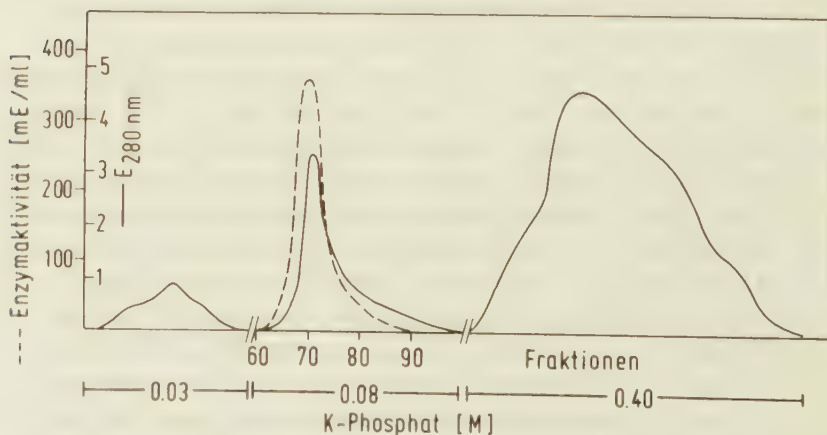


Abb. 9 Chromatographie an Hydroxylapatit
Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 124

2. Die Elution der 6-MSS-Synthetase wurde vereinfacht, indem der von Vogel vorgeschlagene kontinuierliche durch einen stufenförmigen Phosphat-Gradienten ersetzt wurde.

Abbildung 9 zeigt das Elutionsdiagramm einer Chromatographie an Hydroxylapatit. Eine genauere Untersuchung des Elutionspeaks der 6-MSS-Synthetase ergab, daß zuerst Protein mit hoher spezifischer Aktivität eluiert wird. Mit fortschreitender Elution sinkt die spezifische Aktivität. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität unter 50 mE/mg wurden verworfen, das Protein der aktiveren Fraktionen aber mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt.

e) Zentrifugation im diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten

Die noch verbliebenen Verunreinigungen konnten durch eine Zentrifugation im diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten entfernt werden. Die Rohrzuckerkonzentrationen der drei Stufen wurden so gewählt, daß die unterste die Funktion eines Auffangpolsters hatte und die oberste als Trennstrecke diente. Wie aus Abbildung 10 entnommen werden kann, befindet sich die 6-MSS-Synthetase in der mittleren Stufe.

Die Stufengradienten können in einem Festwinkelrotor zentrifugiert werden, was eine Erhöhung der Kapazität und wegen der kleineren Trennstrecken und der höheren Zentrifugationsgeschwindigkeit eine Verkürzung der Zentrifugationszeit bedeutet.

Die Zentrifugation im diskontinuierlichen Rohrzuckergradienten führte mit regelmäßig guten Ausbeuten (etwa 80 %) zu einem Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 140 bis 165 mE/mg. Die nach dieser Vorschrift gereinigte 6-MSS-Synthetase zeigte in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur gelegentlich geringe Verunreinigungen. Das Enzym - aufbewahrt

in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 50 % Glycerin, 1 mM EDTA und 10 mM DTT bei -32°C - verlor in drei Monaten etwa 40 % seiner Aktivität. Tabelle 3 zeigt in einer Übersicht die einzelnen Schritte der Isolierung von 6-MSS-Synthetase, die entsprechenden spezifischen Aktivitäten und die Ausbeuten.

Tab. 3 Anreicherung der 6-MSS-Synthetase

Reinigungs- stufe	Volumen (ml)	Gesamt- aktivität (mE)	Protein (mg)	spez. Aktivität (mE/mg)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	3 000	54 000	38 900	1.4	100
1. PEG- Fällung	410	42 950	6 400	6.7	79
2. PEG- Fällung	75	66 110	2 900	22.7	121
Ammoniumsulfat- Fällung	52	56 060	1 940	28.8	103
Hydroxylapatit konzentriertes Eluat	24	35 880	356	101	66
Zentrifugation im Stufen- gradienten	10	28 730	177	162	53

f) Hydrophobe Chromatographie an 4-Amino-butryl-Sepharose 4 B

An Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B wurden Diaminoalkane verschiedener Kettenlänge gekoppelt. Die noch verbliebenen cyclischen Imidocarbonatgruppen wurden mit einem Überschuß an Äthanolamin inaktiviert. Nach Waschen und Äquilibrieren mit Startpuffer (50 mM K-Phosphat, pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 10 % Glycerin) konnten die Gele mit 6-MSS-Synthetase beladen werden. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten.

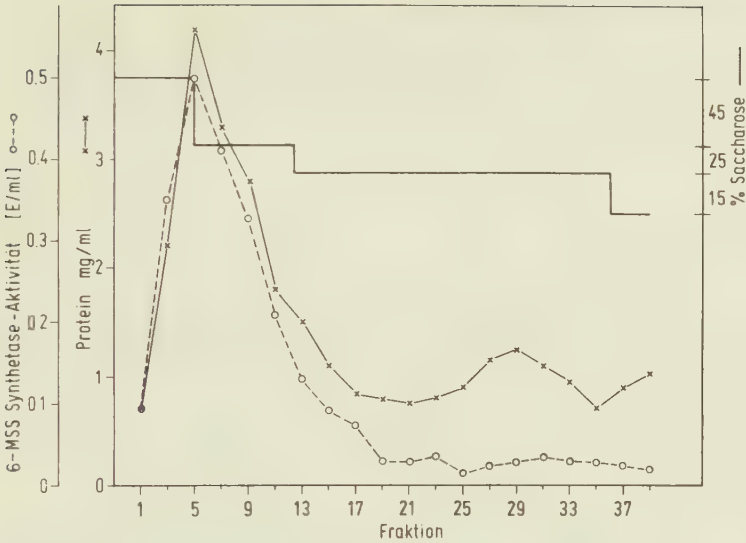


Abb. 10 Zentrifugation im diskontinuierlichen Zuckergradienten. Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 125

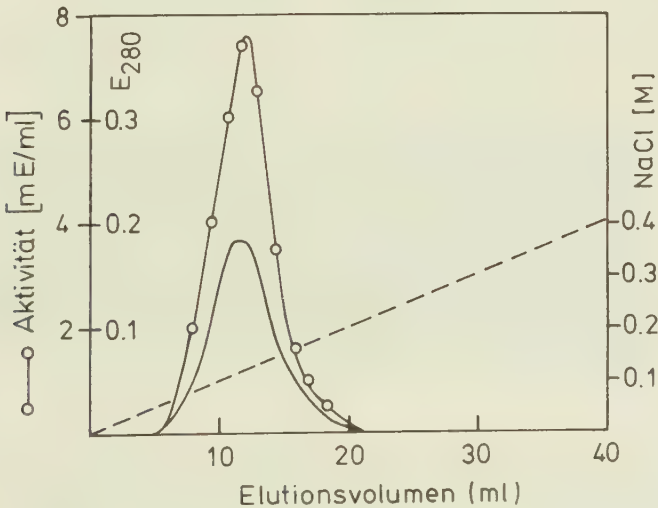


Abb. 11 Chromatographie an 4-Amino-butryl-Sephharose 4 B
Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 125

Mit dieser Methode können Spuren von Begleitproteinen abgetrennt, stark verdünnte Enzymlösungen konzentriert, aber auch niedermolekulare Verbindungen z.B. Mercaptane entfernt werden. Als besonders geeignet erwies sich 4-Amino-butyryl-Sepharose 4 B (Abb. 11).

5. Reinheitskriterien

Die folgenden Untersuchungen wurden mit Enzympräparaten der Rohrucker-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

a) Untersuchung auf Fremdaktivitäten

Die Bestimmung der 6-MSS-Synthetase-Aktivität kann durch FS-Synthetase und 6-MSS-Decarboxylase erheblich gestört werden. Die Anwesenheit aktiver FS-Synthetase konnte jedoch ausgeschlossen werden, da sowohl bei der optischen als auch bei der fluorimetrischen Enzymbestimmung die Stöchiometrie der 6-MSS-Synthese (Gleichung 1) erfüllt war (Tab. 4). Eine 6-MSS-Decarboxylase-Aktivität war nicht nachweisbar. Sie wurde in den beiden Polyäthylenglykol-Fraktionierungen teilweise und in der Ammoniumsulfat-Fraktionierung dann vollständig abgetrennt.

b) Untersuchungen zur Proteineinheitlichkeit

Zur Prüfung des Reinheitsgrades der 6-MSS-Synthetase wurden Zentrifugationen im kontinuierlichen Rohrucker-Dichtegradienten, SDS-Elektrophoresen und Immunoelktrophoresen durchgeführt.

In der Rohrucker-Gradienten-Zentrifugation ergeben die 6-MSS-Synthetase-Aktivität und die Absorption bei 260 nm und 280 nm ein gemeinsames Maximum (Abb. 12). Die unsymmetrische Aktivitäts- und Proteinverteilung sprechen für

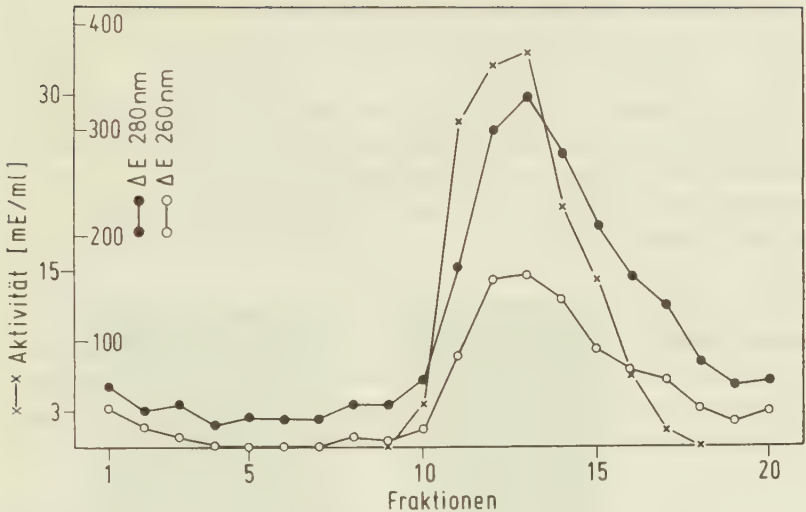


Abb. 12 Rohrucker-Gradienten-Zentrifugation
2 mg 6-MSS-Synthetase wurden auf einen linearen Rohrucker-Dichtegradienten (5-20 % w/v) mit 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 5 mM DTT und 5 mM EDTA aufgesetzt und 12 Stunden bei 2° C und 27 000 Upm in einem SW 27 Rotor (Beckmann) zentrifugiert.
(x-x-x) Enzymaktivität (mE/ml), (o-o-o) Absorption bei 260 nm und (●-●-●) Absorption bei 280 nm.

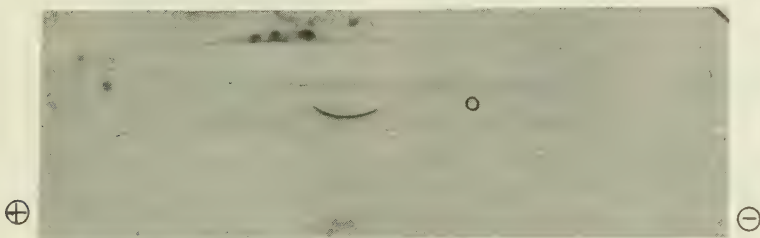


Abb. 14 Immunelektrophorese von gereinigter 6-MSS-Synthetase mit Anti-6-MSS-Synthetase.
Aufgetragen wurden 2 µg 6-MSS-Synthetase. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 mA und 2° C für 120 Minuten. Für die Doppeldiffusion wurde eine unverdünnte Antikörperlösung verwendet.
Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 133

eine Dissoziation des Multienzymkomplexes in kleinere, weniger aktive Untereinheiten.

SDS-Elektrophoresen von Enzymproben der Zentrifugation im kontinuierlichen und diskontinuierlichen Zuckergradienten ergaben jeweils nur eine Proteinbande. Abbildung 13 zeigt, daß auch bei hohen Proteinkonzentrationen keine weiteren Banden erkennbar sind.

Die Immunoelktrophorese, bei der die 6-MSS-Synthetase zunächst einer Elektrophorese in einem Agarosegel und danach der Doppeldiffusion gegen Anti-6-MSS-Synthetase unterworfen wurde, läßt nach der Proteinfärbung nur eine Präzipitationslinie erkennen (Abb. 14).

Tab. 4 Zur Stöchiometrie der 6-MSS-Synthese

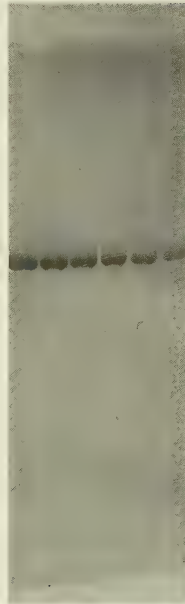
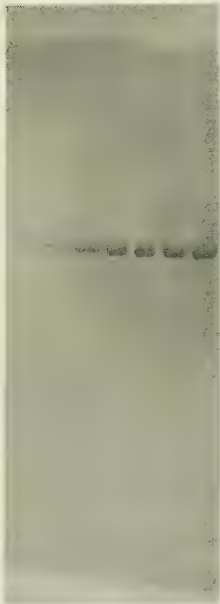
Die Küvette enthielt im Volumen 2 ml: 400 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6, 5 mg Serumalbumin, 400 nMol NADPH, 200 μ g 6-MSS-Synthetase (spez. Akt. 132 mE/mg), Acetyl-CoA und Malonyl-CoA (200 nMol bzw. 400 nMol, sonst wie in der Tabelle angegeben). Der Start der Reaktion erfolgte mit Malonyl-CoA. Die Bestimmungen wurden optisch oder fluorimetrisch verfolgt.
Das Fluorimeter wurde mit 50 nMol 6-MSS geeicht.

eingesetztes Substrat (nMol)	6-MSS-Bildung		NADPH- Verbrauch (nMol)	Bestimmungs- methode
		(nMol)		
Acetyl-CoA	(40)	38.6	-	fluorimetrisch
	(80)	75.4	83.2	fluorimetrisch bzw. optisch
Malonyl-CoA	(80)	27.6	-	fluorimetrisch
	(124)	41.8	-	fluorimetrisch
	(278)	-	89.6	optisch

SDS-Spaltung
bei 37° C

SDS-Spaltung
bei 80° C

0.25 µg
0.50 µg
0.75 µg
1.00 µg
1.25 µg
1.50 µg
2.00 µg



①

Laufrichtung
↓

⊕

Abb 13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von 6-MSS-Synthetase (Stufengradienten-Fraktion). Die SDS-Spaltung erfolgte bei 37° C bzw. 80° C (15 Minuten). Sonstige Bedingungen siehe Seite 128

III. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

1. Untersuchungen zum Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase

Die erste Bestimmung des Molekulargewichts der 6-MSS-Synthetase wurde von Light (34) nach der Methode von Martin und Ames (38) in einem linearen Gradienten von 5 bis 20 % Saccharose mit zellfreiem Extrakt durchgeführt. Das Molekulargewicht wurde mit 370 000 angegeben, bezogen auf Katalase als Standardprotein. Dimroth (6,7) erhielt mit der gleichen Methode und dem gleichen Referenzprotein ein dreifach höheres Molekulargewicht (1.1×10^6). Da beide Autoren die gleiche Bestimmungsmethode verwendeten, sollten nicht methodische Fehler Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse sein. Wir befaßten uns erneut mit der Bestimmung des Molekulargewichts der 6-MSS-Synthetase, zumal der Multienzymkomplex nach einem anderen Verfahren gereinigt wurde.

a) Bestimmung des Molekulargewichts aus der Sedimentationskonstanten

α) Sedimentationskonstante der 6-MSS-Synthetase

Mit 6-MSS-Synthetase wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Sedimentationsläufe durchgeführt. Verfolgt wurde die Verschiebung der bei der Sedimentation entstehenden Grenzschrift zwischen den sedimentierenden Proteinmolekülen und der Pufferlösung, woraus sich nach Gleichung 2 die Geschwindigkeit der Grenzschriftverschiebung und damit die Sedimentationskonstante bestimmen ließ.

$$(2) \quad S = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \quad \text{oder} \quad S = \frac{2.303 (\log r_2 - \log r_1)}{60 \omega^2 (t_2 - t_1)}$$

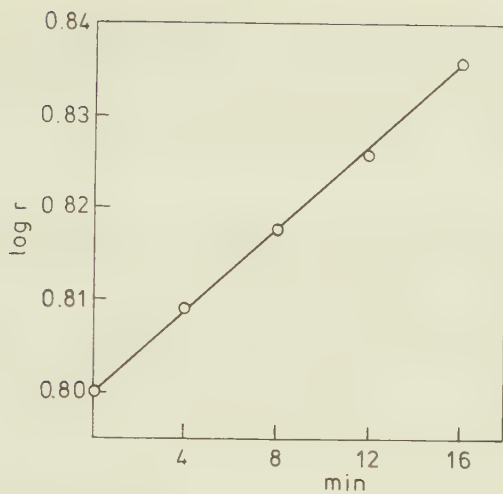


Abb. 15 Abstand der Protein-Puffer-Grenze vom Rotationszentrum in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit nach Erreichen der maximalen Geschwindigkeit (60 000 Upm, 20.0° C).

Tab. 5 Bestimmung der Sedimentationskonstanten der 6-MSS-Synthetase.

Die Sedimentation erfolgte in einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Modell E, Beckmann) bei 60 000 Upm (20.0° C). Die optische Dichte der Proteinlösungen betrug bei 280 nm 0.6 bis 0.7.

Nr	Puffersystem	S _{app}	Mol. Gew.
942/76	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0	19.4	700 000
945/76	0.1 M K-Phosphat, pH 7.8	20.1	740 000
959/76	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0	16.2	520 000
962/76	0.1 M K-Phosphat, pH 7.8	16.0	500 000
990/76	0.1 M K-Phosphat, pH 8.0	17.7	620 000
993/76	0.1 M K-Phosphat, pH 7.8	18.5	650 000
1004/76	0.1 M K-Phosphat, pH 7.8	18.5	650 000

Die Sedimentationsläufe 945/76 und 962/76 wurden mit rekonstituierter 6-MSS-Synthetase, die zuvor mit LiCl gespalten worden war, durchgeführt (vgl. Abschnitt V.3.).

In Abbildung 15 ist der Logarithmus des Abstandes der Protein-Puffer-Grenze vom Rotationszentrum in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Tabelle 5 enthält die Zusammenstellung der aus verschiedenen Zentrifugationen ermittelten Sedimentationskonstanten.

Bei allen Sedimentationsläufen wurde neben einer Hauptkomponenten, die mit 16 bis 20 S sedimentierte, noch eine lang-samer sedimentierende Komponente mit 6 bis 7 S beobachtet, deren Anteil an der Gesamtaborption bei 280 nm bis zu 20 % betragen konnte, obgleich die für diese Versuche eingesetzte 6-MSS-Synthetase den oben genannten Reinheitskriterien genügte. Ungewöhnlich groß sind die Unterschiede zwischen den aus verschiedenen Sedimentationsläufen ermittelten Sedimentationskonstanten für native 6-MSS-Synthetase. Ob die Aus-

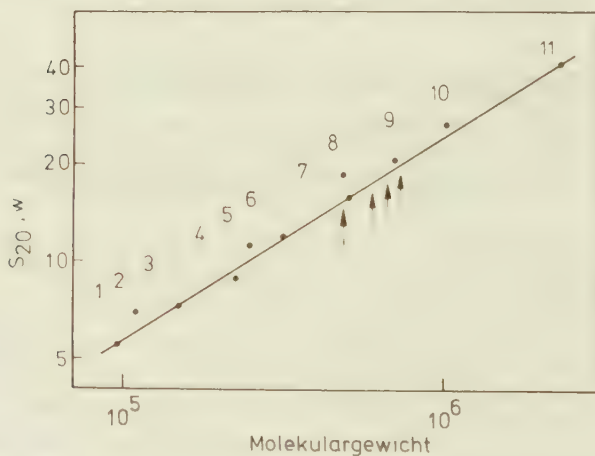


Abb. 16 Molekulargewichtsbestimmung der 6-MSS-Synthetase
Die Daten für die Eichgeraden sind dem Handbook of Biochemistry, 1971, entnommen (37).
(1) α -Amylase, (2) Laktat-Dehydrogenase, (3) Aldolase, (4) γ -Globulin, (5) Katalase, (6) β -Galaktosidase, (7) Cytochrom b₁ (E.coli), (8) Glutamat-Dehydrogenase und (9) Fettsäuresynthetase (Hefe).

wertung der Sedimentationskurven (Abb. 18 C) mit einem zu großen Fehler behaftet ist oder ob dem Multienzymkomplex verschiedene Sedimentationskonstanten zugeordnet werden können, sollen die folgenden Versuche zeigen.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der 6-MSS-Synthetase aus der Sedimentationskonstanten ist die Kenntnis der Diffusionskonstanten und des partiellen, spezifischen Volumens erforderlich. Für eine erste Abschätzung des Molekulargewichts genügt jedoch der Vergleich mit Sedimentationskonstanten verschiedener Proteine, deren Molekulargewichte bekannt sind. Mit Hilfe einer Eichgeraden (Abb. 16) können den Sedimentationskonstanten der 6-MSS-Synthetase Molekulargewichte zwischen 500 000 und 750 000 zugeordnet werden. Diese Werte liegen deutlich über dem von Light angegebenen und unter dem von Dimroth bestimmten Molekulargewicht von 370 000 bzw. 1 300 000.

8) Einfluß des pH-Wertes auf die Sedimentationskonstante

In einer Reihe von Sedimentationsläufen wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Sedimentationskonstante der 6-MSS-Synthetase untersucht. Die Enzymlösungen wurden dazu zwei Stunden vor der Zentrifugation bei 20° C in 0.1 M Phosphat- bzw. Tris-HCl-Puffer mit pH-Werten zwischen 6.0 und 10.0 inkubiert. Die Zentrifugationsbedingungen entsprachen denen der vorausgegangenen Versuche.

Im pH-Bereich zwischen 6.5 und 10.0 sind - wie die Meßergebnisse in Abbildung 17 zeigen - stets eine große und eine kleine Proteinkomponente im konstanten Verhältnis nachweisbar. Für den leichteren Proteinanteil beträgt die Sedimentationskonstante 9.5 S. Die Sedimentationskonstante der schwereren Proteinkomponenten, für die zwischen pH 6.5 und 8.0 ein Wert von 18 S ermittelt wurde, nimmt im alkalischen pH-Bereich deutlich ab. Dies kann mit einer partiellen Auffaltung der

globulären Struktur des Multienzymkomplexes erklärt werden. Der dadurch erzeugte "Schwimmgürteleffekt" bedeutete eine Verzögerung der Sedimentationsgeschwindigkeit und tauscht deshalb ein geringeres Molekulargewicht vor. Vermutlich ist eine derartige Auffaltung auf eine unter alkalischen Milieubedingungen stattfindende, negative Aufladung der Proteinoberflächen zurückzuführen, woraus eine Abstoßung gleichsinnig geladener Untereinheiten resultiert.

Die Inkubation der 6-MSS-Synthetase bei pH 6.0 führte innerhalb weniger Minuten zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Eine dazu parallel durchgeführte Untersuchung in der analytischen Ultrazentrifuge offenbarte einen völligen Zusammenbruch der Proteinstruktur (Abb. 18 A). Eine Auswertung dieses Sedimentationslaufes war daher nicht möglich. Daß der

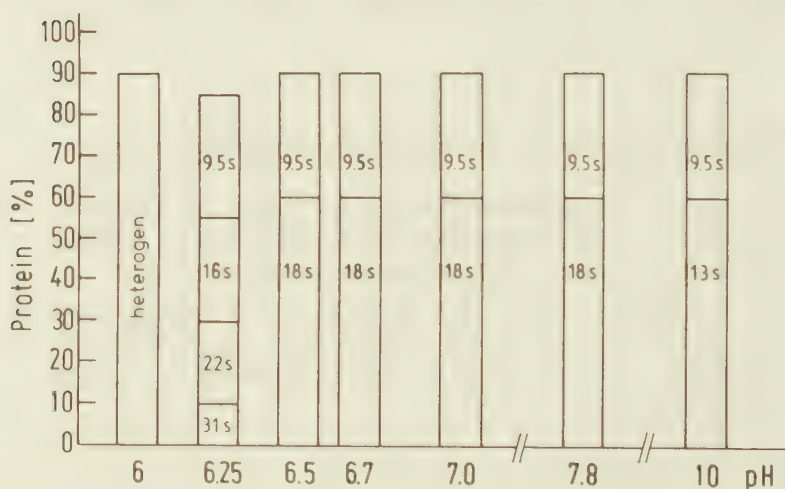


Abb. 17 Einfluß der pH-Änderung auf das Sedimentationsverhalten der 6-MSS-Synthetase. Proteinverteilung in der Meßzelle 16 Minuten nach Erreichen der maximalen Zentrifugationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Proteinkonzentration wurde durch Absorption bei 280 nm bestimmt.

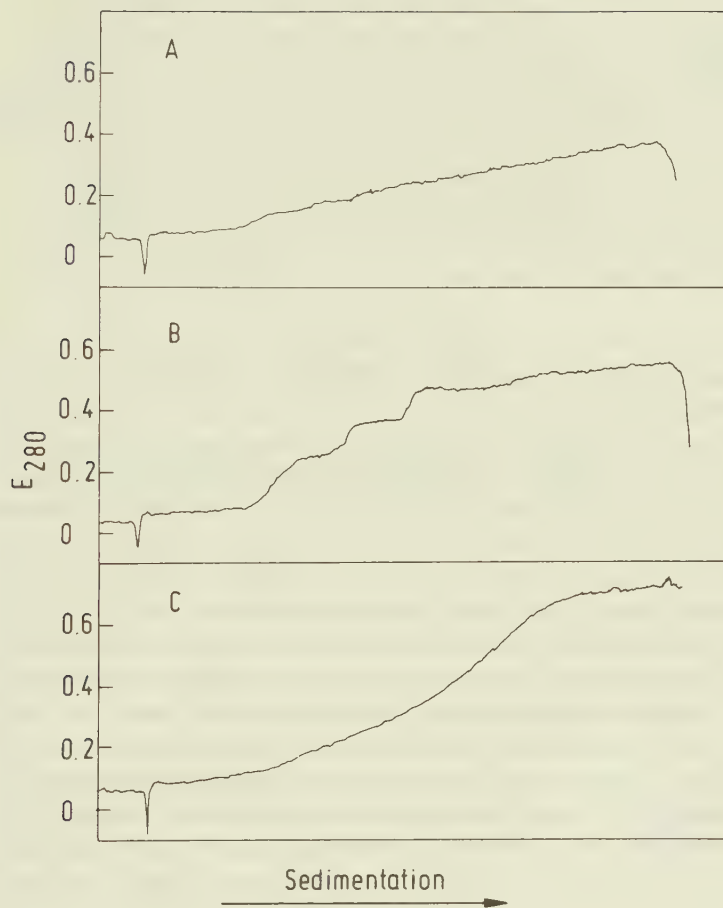


Abb. 18 Einfluß der pH-Änderung auf das Sedimentationsverhalten der 6-MSS-Synthetase.
Proteinverteilung in der Meßzelle 16 Minuten nach Erreichen der maximalen Geschwindigkeit (60 000 Upm)
A: pH 6.0, B: pH 6.25, C: pH 7.8.
Einzelheiten im Text.

irreversible Denaturierungsprozeß nicht spontan und ungeordnet verläuft, ergab eine Sedimentationszentrifugation bei pH 6.25 (Abb. 18 B). Von Anfang an können vier Proteinkomponenten mit S-Konstanten von 30.5, 21.6, 16.5 und 9.5 S unterschieden werden. Im Verlauf der Zentrifugation entsteht noch eine weitere Proteinspezies mit 17.3 S, was auch den während des Sedimentationslaufs beobachteten Selbstschärfungseffekt erklärt. Ist die Struktur dieser Proteinkomponenten während der Zentrifugation globulär, können den Sedimentationskonstanten die Molekulargewichte 1 400 000, 760 000, 530 000, 500 000 und 200 000 zugeordnet werden.

Es ist verlockend, das Auftreten mehrerer Proteinkomponenten mit verschiedenen Sedimentationskonstanten als eine Zerfallsreihe ausgehend von einem hexameren Komplex über die Stufen von Tetrameren, Trimeren, Dimeren zu Monomeren zu interpretieren. Aufgrund der vorausgegangenen Untersuchungen zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten nativer 6-MSS-Synthetase scheint es jedoch plausibler, daß der tetramere Komplex in mehreren Konformationen verschiedener Auffaltungsgrade vorliegen kann. Die labilste Struktur würde danach in 9.5 S - Untereinheiten zerfallen. Schwierig bleibt aber, das Auftreten der nur in diesem einen Sedimentationslauf beobachteten 30 S - Proteinspezies, der ein Molekulargewicht von 1.4×10^6 entspricht, zu erklären. Ob diese Proteinkomponente wegen des geringen Anteils bei allen anderen Sedimentationsläufen unentdeckt blieb oder ob es sich um eine nur unter diesen pH-Bedingungen stattfindende Aggregatbildung handelt, wissen wir nicht.

b) Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts

Eine genauere Bestimmung des Molekulargewichts der 6-MSS-Synthetase ist mit der Methode der Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation möglich, da weder der Reibungskoeffizient und damit die Molekülgestalt noch der Hydratationszustand in die Berechnung eingehen. Nach Gleichung 3 ergibt sich bei einer Auftragung von $\ln c$ gegen r^2 das Molekulargewicht als Steigung der Geraden.

$$(3) \quad MG = \frac{2 RT/\omega^2}{(1 - \rho V)} \frac{d \ln c}{d r^2}$$

(MG = Molekulargewicht, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur, V = partielles spezifisches Volumen, ρ = Dichte der Lösung, r = Abstand vom Rotationszentrum, c = Konzentration des Proteins bei r)

Die Zentrifugationsgeschwindigkeit, bei der die 6-MSS-Synthetase nicht zu Boden sedimentiert, liegt bei 2 800 Upm (20.0° C). Abbildung 19 zeigt die Proteinverteilung in der Meßzelle 15 Stunden nach Erreichen des Sedimentationsdiffusionsgleichgewichts. Die Auswertung dieses Versuches ergibt eine Kurve mit einer schwachen Aufwärtskrümmung, ein Zeichen für das polydisperse Verhalten der 6-MSS-Synthetase (Abb. 20). Da eine Verunreinigung des Enzympräparats durch Fremdprotein ausgeschlossen werden kann, ist die Polydispersität, wie sie auch von anderen Systemen beschrieben wird (39,40), entweder auf eine irreversible Dissoziation des Multienzymkomplexes oder auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den 18 S - und 9 S - Komponenten zurückzuführen. Um Aufschluß über die Art der Polydispersität bei der 6-MSS-Synthetase zu erhalten, sind weitere Versuche notwendig, die bei niedrigeren Temperaturen und mit verschiedenen Proteinkonzentrationen durchzuführen sind.

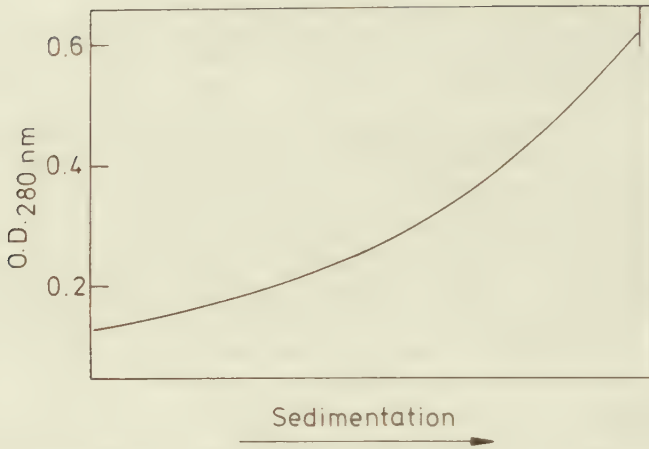


Abb. 19 Proteinverteilung in der Meßzelle nach Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts. Der Versuch wurde bei 20° C und 2800 U_{pm} in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, durchgeführt. Die senkrechte Linie gibt den Zellboden an. Die Anfangskonzentration betrug 0.36 mg/ml. Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 126

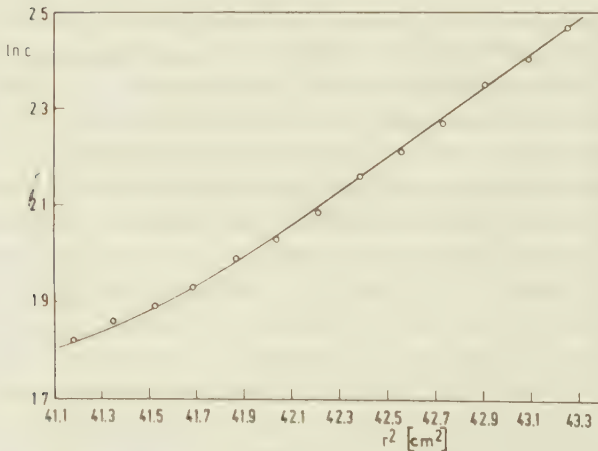


Abb. 20 Auswertung der Gleichgewichtssedimentationszentrifugation (Abb. 19).

Nach der Methode der Sedimentation-Gleichgewichtszentrifugation ergibt sich für die 6-MSS-Synthetase ein Molekulargewicht von $(7.9 \pm 1.5) \times 10^5$. Die Genauigkeit der Bestimmung wird durch die Gegenwart einer 7 S - Komponenten beeinträchtigt, deren Anteil während der 48-stündigen Zentrifugation bis zu 15 % anstieg.

c) Molekulargewichtsbestimmung nach der Methode der Gelpermeationschromatographie

Das Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase wurde auch nach der Methode der Gelpermeationschromatographie an Sepharose 6 B bestimmt. Von den verschiedenen, bekannten Auswertungsmethoden (41-43) wurde der nach Whitaker der Vorzug gegeben, der folgende Beziehung zugrunde liegt:

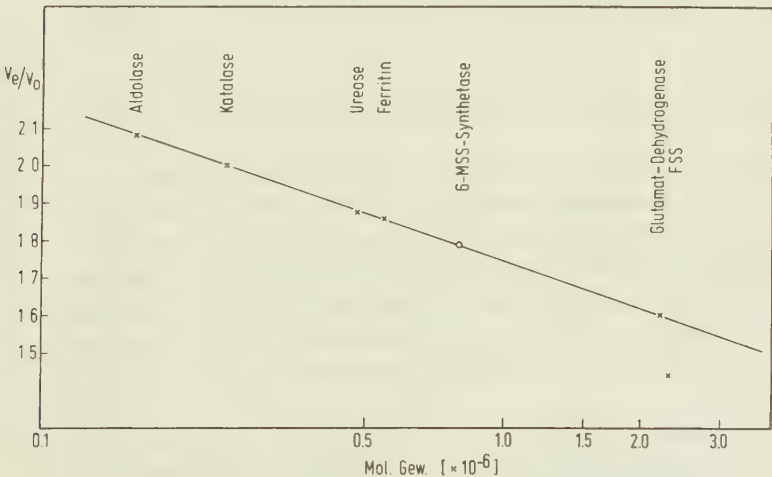


Abb. 21 Molekulargewichtsbestimmung für die 6-MSS-Synthetase durch Gelpermeationschromatographie an Sepharose 6 B.
Eichproteine: Aldolase 160 000, Katalase 235 000, Urease 483 000, Ferritin 540 000, Glutamat-Dehydrogenase 2 200 000 und Hefe-FS-Synthetase 2 300 000.
Experimentelle Einzelheiten: Siehe Seite 38 und 127.

$$(4) \quad V_e/V_o = k \log MG$$

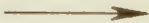
(V_e = Elutionsvolumen, V_o = Ausschlußvolumen, MG = Molekulargewicht und k = Konstante)

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde das Ausschlußvolumen (V_o) mit Dextranblau (44) und die Elutionsvolumina (V_e) der in Abbildung 21 angegebenen Eichproteine bestimmt. Für jede Bestimmung wurden etwa 5 mg Protein in 0.2 bis 0.5 ml auf eine Sepharose 6B - Säule (1.6 x 150 cm) aufgetragen.

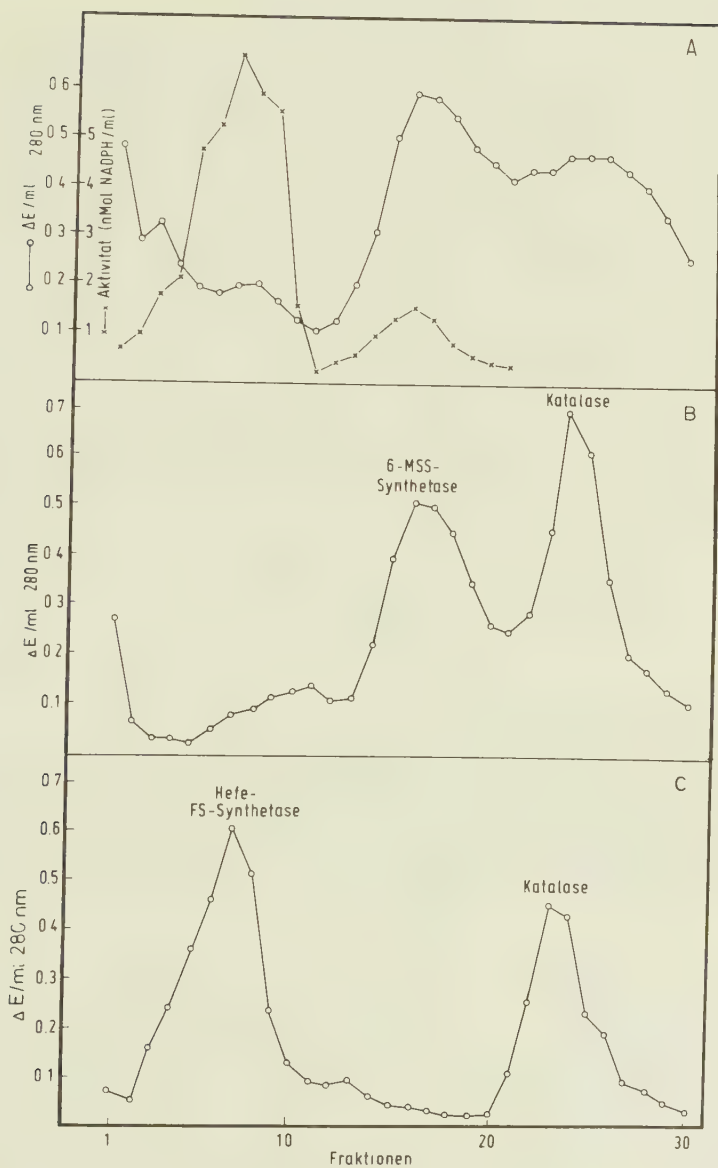
Nach dieser Methode wurde aus fünf Bestimmungen für die 6-MSS-Synthetase ein Molekulargewicht von $780\,000 \pm 80\,000$ ermittelt. Gelegentlich wurde noch eine weitere Proteinfraction beobachtet, der ein Molekulargewicht von 360 000 zugeordnet werden konnte. Die Enzymaktivität für die Gesamtreaktion ging während der Chromatographie immer verloren.

d) Bestimmung nach der Methode von Martin und Ames

Das nach verschiedenen Verfahren ermittelte Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase von etwa 780 000 weicht deutlich von dem von Dimroth nach der Methode von Martin und Ames (38) bestimmten Wert mit 1.3×10^6 ab. Es ist denkbar, daß der Multienzymkomplex während der Enzymreinigung - möglicherweise während der Chromatographie an Hydroxylapatit - einer Strukturänderung unterworfen ist. Um dies

- Abb. 22  Auswertung der Rohruckergradienten zur Molekulargewichtsbestimmung der 6-MSS-Synthetase nach der Methode von Martin und Ames.
- A: 6-MSS-Synthetase ohne Säulenschritte angereichert.
 - B: 6-MSS-Synthetase nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren angereichert mit Katalase als internem Standard.
 - C: Hefe-FS-Synthetase und Katalase.

Rotor: SW 40 Ti, 36 000 Upm, Laufzeit 10 Stunden bei 2°C . Je Becher wurden ca. 1.5 mg Protein aufgetragen. Die Becher wurden von unten fraktioniert.



zu prüfen, modifizierten wir das in dieser Arbeit verwendete Reinigungsverfahren, indem der säulenchromatographische Schritt und die anschließende Stufengradientenzentrifugation durch die von Dimroth beschriebene Ultrazentrifugation und Zentrifugation im linearen Rohrzuckergradienten ersetzt wurden. Zum Vergleich wurde ein nach unserem Verfahren gereinigtes Enzympräparat und zwei weitere Proteine als interner bzw. externer Standard mitzentrifugiert. Als Standardproteine wählten wir Katalase (235 000 (45)) und Hefe-FS-Synthetase (2.3×10^6 (46)). Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten im Schwerfeld nach Gleichung 5

$$(5) \quad v = \frac{S_x}{S_{St}} = \frac{\text{Entfernung des unbekannten Proteins vom Meniskus}}{\text{Entfernung des Standardproteins vom Meniskus}}$$

und durch Berechnung des Molekulargewichts nach Gleichung 6

$$(6) \quad v = \frac{S_x}{S_{St}} = \left(\frac{MG_x}{MG_{St}} \right)^{2/3}$$

Die Auswertung der Zentrifugation im linearen Zuckergradienten (Abb. 22) ergab für die 6-MSS-Synthetase ein Molekulargewicht von 800 000 bezogen auf Katalase und 1.1×10^6 bezogen auf Hefe-FS-Synthetase. Das Verfahren, nach dem der Multienzymkomplex angereichert wird, hat offenbar keinen Einfluß auf das Molekulargewicht.

2. Die Untereinheiten der 6-MSS-Synthetase

a) Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten

Um einen ersten Einblick in den Aufbau des Multienzymkomplexes zu erhalten, ist dessen vollständige Dissoziation in die ihn aufbauenden Polypeptidketten notwendig. Dies kann durch eine Behandlung mit Harnstoff, Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoäthanol erreicht werden. Da Natriumdodecylsulfat mit Polypeptidketten komplexiert, das Beladungsverhältnis bei vielen Proteinen ziemlich konstant 1.4 mg SDS pro mg Protein beträgt und die Ladung des Protein-Dodecylsulfat-Komplexes weitgehend vom Dodecylsulfat bestimmt wird, kann das Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase-Untereinheiten dadurch bestimmt werden, daß die relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der SDS-beladenen Polypeptidketten mit denen bekannten Molekulargewichts verglichen werden (47,48). Diese Methode wurde von Weber und Osborn mit einer großen Anzahl von Proteinen bekannter Quartärstruktur überprüft (49).

In Gegenwart von 8 M Harnstoff, 0.6 M β -Mercaptoäthanol und 2 % Natriumdodecylsulfat wurde die 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Temperaturen (37° , 80° und ca 100° C) zwischen 5 und 30 Minuten inkubiert und in einem Disk-SDS-System mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 5 bis 15 % Acrylamid einer Elektrophorese unterworfen (51).

Wie bereits beim Nachweis der Proteineinheitlichkeit der gereinigten 6-MSS-Synthetase mit Hilfe der Polyacrylamidgel-SDS-Elektrophorese gezeigt werden konnte, ist nur eine mit Coomassie anfärbbare Proteinbande zu erkennen. Diese kann weder in einem flacheren Polyacrylamidgradienten (3.5 bis 8 %), noch durch Verlängerung der Trennzeit und Trennstrecke, auch nicht durch Wahl verschiedener Proteinkonzentrationen in mehrere Proteinbanden aufgetrennt werden. Hiermit ist gezeigt,

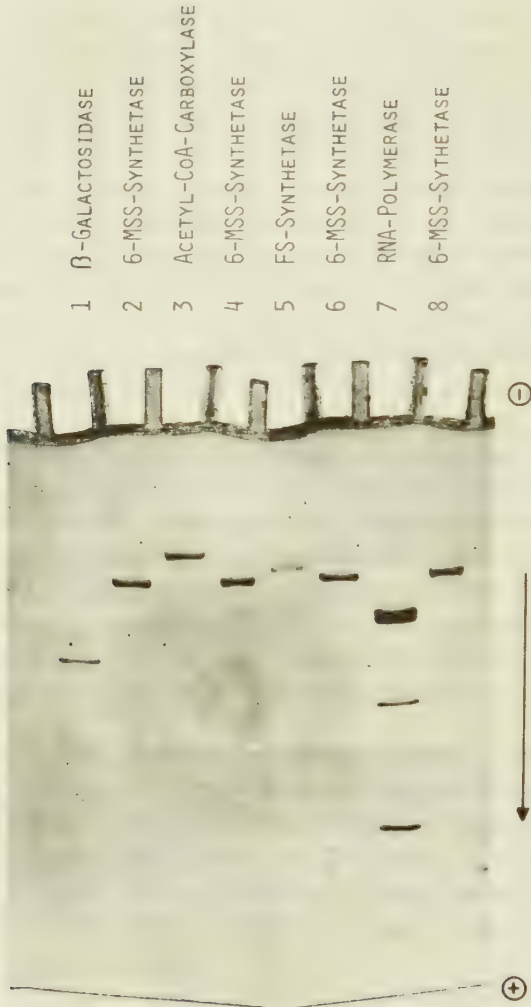


Abb. 23 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von 6-MSS-Synthetase und den oben angegebenen Eichproteinen. Spalt- und Elektrophoresebedingungen siehe experimenteller Teil Seite 128.

daß sich die 6-MSS-Synthetase aus Polypeptidketten mit gleichem oder nahezu gleichem Molekulargewicht zusammensetzt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der 6-MSS-Synthetase-Untereinheiten wurden als Referenzproteine Hefe-FS-Synthetase, RNA-Polymerase aus *E. coli* und Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe nach der oben beschriebenen Methode in ihre Untereinheiten dissoziiert und ihre relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten bestimmt. Trägt man diese gegen den Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte auf, ergibt sich aus einer Dreifachbestimmung für das Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase-Untereinheiten 176 000 (Abb. 23 und 24).

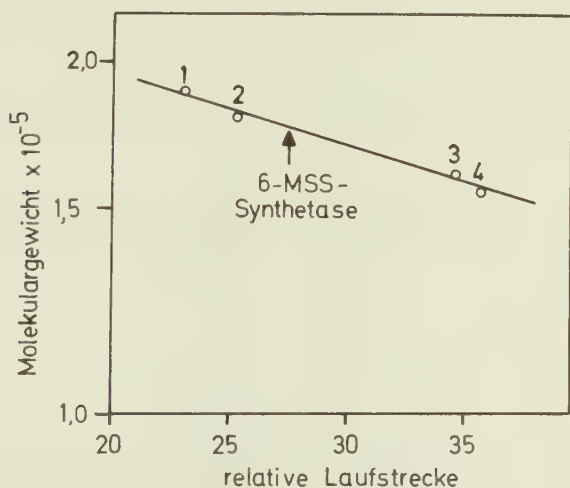


Abb. 24 Auswertung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Aufgetragen ist die Beziehung zwischen der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichts für 6-MSS-Synthetase und die Eichproteine.
Eichproteine: (1) Acetyl-CoA-Carboxylase (Hefe) (189 000 (29)), (2) FS-Synthetase (Hefe) (180 000 (22)) und (3) RNA-Polymerase-Untereinheiten β und β' aus *E. coli* (160 000 bzw. 155 000 (50)).

Aus diesem Ergebnis folgt für den Aufbau der 6-MSS-Synthetase:

1. Der Multienzymkomplex mit einem Molekulargewicht von 790 000 besteht aus vier gleich großen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 176 000. Die Strukturvariante mit einem Molekulargewicht von 1.3×10^6 baut sich demnach aus sechs Polypeptidketten auf und der von Light (34) untersuchte Enzymkomplex aus zwei Untereinheiten.
2. Bei keiner dieser SDS-elektrophoretischen Untersuchungen konnte eine kleinere Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 20 000, das dem von Greull (8) aus der 6-MSS-Synthetase isolierten Acyl-Carrier-Protein entsprechen würde, nachgewiesen werden.
3. Da nicht jeder Polypeptidkette nur eine Teilaktivität zugeordnet werden kann, besteht auch die 6-MSS-Synthetase aus multifunktionellen Polypeptidketten, wie dies z.B. auch für die Hefe-FS-Synthetase (23) und die Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe (29) gezeigt werden konnte.

Unbeantwortet ist die Frage, ob es sich bei der 6-MSS-Synthetase um identische oder nicht-identische Polypeptidketten handelt.

b) Zur Identität der Untereinheiten

Nach Spaltung mit Harnstoff, Dodecylsulfat und β -Mercapto-äthanol verhält sich die 6-MSS-Synthetase in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese einheitlich. Daraus kann aber nicht auf die Existenz von identischen Untereinheiten geschlossen werden. Auch bei der Hefe-FS-Synthetase konnte in zahlreichen Versuchen mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine einzige Bande (Abb. 23) nachgewiesen werden, obwohl die Arbeiten von Schweizer (15-23) und Engeser (52) zeigen, daß die Hefe-FS-Synthetase aus zwei nicht-iden-

tischen Polypeptidketten besteht. Engeser und Wieland konnten die Cystein- und Lysinseitenketten Guanidin-Hydrochlorid-denaturierter FS-Synthetase mit Jodessigsäure und 2-Methylmaleinsäureanhydrid carboxymethylieren bzw. citraconylieren und dadurch die Ladungsverhältnisse der beiden nahezu gleich großen Polypeptidketten modifizieren, daß diese sich in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in zwei dicht beieinanderliegende, gleich stark anfärbbare Banden auftrennen ließen. Wurde die FS-Synthetase zuvor mit ^{14}C -Jodacetamid beladen, konnte die gesamte Radioaktivität in der schneller wandernden Bande gefunden werden.

Ohne weitere Modifikationen übernahmen wir das in unserem Arbeitskreis ausgearbeitete Verfahren. Bei der 6-MSS-Synthetase konnte aber mit dieser Methode keine Auftrennung in nicht-identische Untereinheiten erreicht werden, wie dies in einem Vergleichsansatz mit FS-Synthetase geschah (Abb. 25).



Abb. 25 Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Hefe-FS-Synthetase (links) und 6-MSS-Synthetase (rechts) nach Behandlung mit DTNB, 7M Guanidin-HCl, nach Carboxymethylierung und Citraconylierung. Experimentelle Einzelheiten siehe Seite 129.

Dieses Ergebnis spricht für einen Aufbau der 6-MSS-Synthetase aus identischen Untereinheiten. Es überrascht allerdings, daß eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 176 000 Träger der sieben oder acht für die 6-MSS-Synthese notwendigen Teilaktivitäten ist. Nimmt man für den eine Teilaktivität beanspruchenden Proteinbereich ein Molekulargewicht von 25 000 bis 30 000 an, dann sind fünf bis sieben Teilaktivitäten mit eigenen Domänen denkbar. Es ist aber durchaus möglich, daß die Polypeptidketten der 6-MSS-Synthetase eine geringere Anzahl von Domänen enthalten. Sind nämlich das kondensierende Teilenzym und die für den Ringschluß verantwortliche Aktivität im Bereich einer Domäne lokalisiert und vermag eine Transferase den Acetyl- und Malonyl-Transfer, sowie die Hydrolyse der enzymgebundenen 6-MSS zu katalysieren, sind vier Domänen ausreichend.

Von diesen Überlegungen abgesehen, kann - was jedoch weniger wahrscheinlich ist - mit dieser Versuchsanordnung nicht ausgeschlossen werden, daß sich Ladung und Molekulargewicht der Polypeptidketten gerade so weit kompensieren, daß eine elektrophoretische Auftrennung nicht-identischer Untereinheiten nicht möglich ist. Deshalb bedarf die Frage nach der Existenz von identischen bzw. nicht-identischen Polypeptidketten noch einer eingehenderen, proteinchemischen Untersuchung.

c) Zur Stöchiometrie der Untereinheiten im Multienzymkomplex

Die Verbrückung nativer 6-MSS-Synthetase mit dem bifunktionalen Reagens Dimethyl-3,3'-(Tetramethyldioxy)dipropionimidat führt zu einer kovalenten Verknüpfung der Monomeren im Proteinkomplex (53,54). Verbrückte Untereinheiten lassen sich mit Natriumdodecylsulfat, Harnstoff und β -Mercaptoäthanol nicht dissoziieren. Statistisch sind alle Kombinationen von möglichen Verknüpfungen zu erwarten. Die elektrophoretische Analyse verbrückter und anschließend SDS-gespaltener 6-MSS-Synthetase erlaubt, die Anzahl der Monomeren im Komplex und daraus auch das Molekulargewicht des Gesamtkomplexes zu bestimmen.

aufgetragene Menge Protein (μg)	6	9	6	9	6	9	6
Verbrückungsreagens: Protein	-	5:1	5:1	4:1	4:1	3:1	3:1

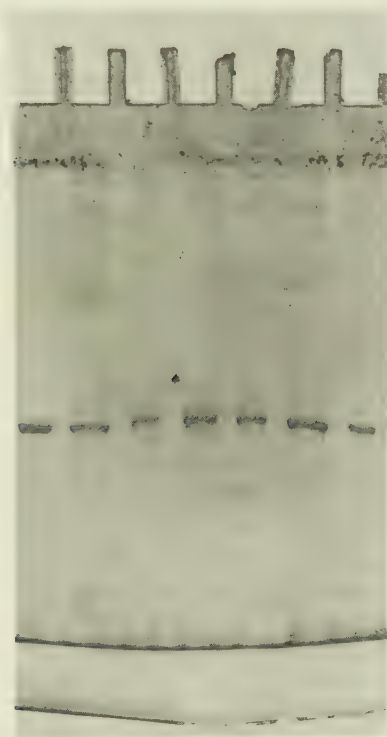


Abb. 26 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von 6-MSS-Synthetase nach Verbrückung mit Dimethyl-3,3'-(Tetramethyldioxy)dipropionimidat. Verbrückte und über einen Rohrzuckergradienten angereicherte 6-MSS-Synthetase wurde mit SDS gespalten (45 Minuten bei 65° C). Elektrophoresebedingungen: Plattengel mit einem linearen Gradienten von 3.5 bis 8 % Acrylamid, ca. 10 Stunden bei 200 V.

Tasche 1: unverbrückte 6-MSS-Synthetase
 Taschen 2 - 7: 6-MSS-Synthetase, versetzt mit verschiedenen Mengen Verbrückungsreagens.

Um intermolekulare Verbrückungen auszuschließen, wurde die intravernetzte 6-MSS-Synthetase über eine Rohrzucker-Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert und danach einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. Wie Abbildung 26 zeigt, können mit diesem Verfahren vier Proteinbanden nachgewiesen werden, von denen die kleinste Untereinheit die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die nicht-verbrückte, SDS-gespaltene 6-MSS-Synthetase aufweist. Unter dem Vorbehalt, daß intermolekulare Vernetzungen ausgeschlossen werden können, besteht der Multienzymkomplex aus vier identischen Polypeptidketten. Da für die kleinste Untereinheit der 6-MSS-Synthetase ein Molekulargewicht von 176 000 bestimmt wurde, ergibt sich für den tetrameren Komplex ein Molekulargewicht von 704 000.

3. Elektrophoretische Untersuchungen

a) Verhalten der 6-MSS-Synthetase in der Disk-Elektrophorese

Mit gereinigter 6-MSS-Synthetase wurden in verschiedenen Puffersystemen - 50 mM und 100 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.8 und 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.9 - bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen Disk-Elektrophoresen durchgeführt. Bei allen Versuchen waren zwei bis sechs Proteinbanden nachweisbar, was teilweise auch von Vogel (30) beobachtet wurde. Aus diesem Grunde konnte das elektrophoretische Verhalten der nativen 6-MSS-Synthetase nicht als Reinheitskriterium herangezogen werden. Gezeigt werden konnte jedoch, daß es sich bei den elektrophoretisch trennbaren Proteinspezies um Artefaktformen der 6-MSS-Synthetase handelt.

6-MSS-Synthetase wurde einer halbpräparativen Disk-Elektrophorese unterworfen. Zur Lokalisierung der Proteinbanden wurde vom Gel ein schmaler Streifen abgetrennt und angefärbt. Entsprechend dem Bandenmuster wurde das Gel in Scheibchen zerschnitten und mit einem 0.1 %-igen SDS-haltigen Puffer das in den Gelen eingeschlossene Protein eluiert. Zur Analyse der Proteinbanden in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die zuvor durch Lyophilisation konzentrierten Proteinlösungen mit Harnstoff, SDS und β -Mercaptoäthanol versetzt und einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen.

Das Ergebnis der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abb. 27) zeigt, daß alle disk-elektrophoretisch unterscheidbaren Proteinbanden aus gleich großen Untereinheiten aufgebaut sind, die sich weder untereinander noch von der SDS-behandelten Enzymprobe, mit der keine Disk-Elektrophorese durchgeführt wurde, unterscheiden.

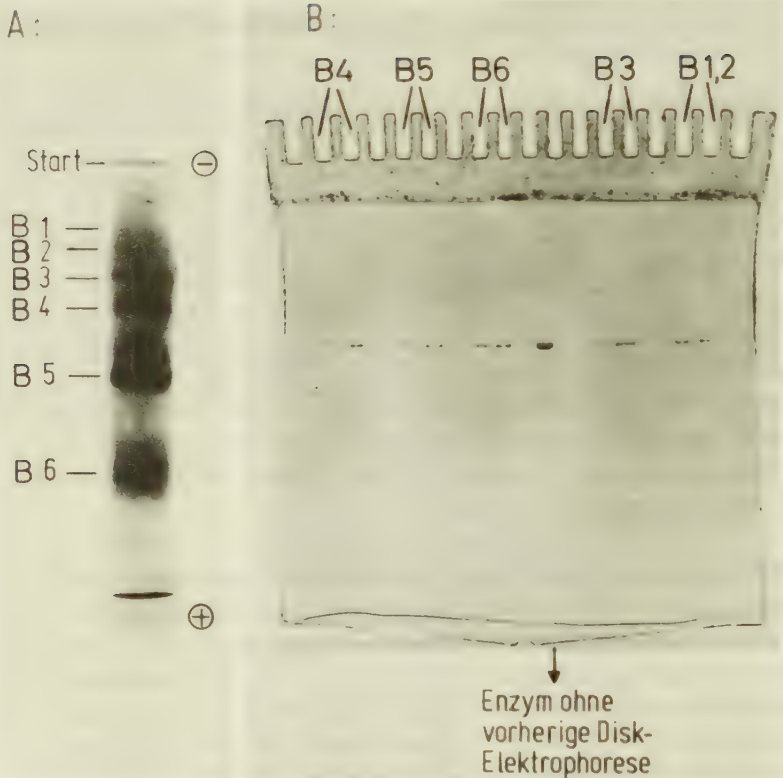


Abb. 27

A: Disk-Elektrophorese von 6-MSS-Synthetase

200 µg 6-MSS-Synthetase wurden auf ein Polyacrylamidgel mit einem 5 %igen Trenngel und einem 3.5 %igen Sammelgel aufgetragen. Abmessungen des Gelröhrchens: 120 x 8 mm. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 mA/Gel. Weitere Einzelheiten: siehe Seite 127.

B: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die bei der Disk-Elektrophorese erhaltenen Proteinbanden wurden eluiert, das Protein in 6 M Harnstoff, 5 % β-Mercaptoäthanol und 2 % SDS gespalten (15 Minuten bei 75° C) und auf ein Plattengel mit einem linearen Gradienten von 5 bis 15 % Acrylamid aufgetragen. Weitere Einzelheiten: siehe Seite 128.

b) Disk-Elektrophoresen bei verschiedenen Acrylamid-
konzentrationen

Ferguson (55) bestimmte das Molekulargewicht globulärer Proteine durch Vergleich der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten in einer Reihe von Gelen mit verschiedenen Porengrößen mit den Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen bekannten Molekulargewichts. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, Aussagen zu den Molekulargewichten der einzelnen disk-elektrophoretisch unterscheidbaren Proteinkomponenten der 6-MSS-Synthetase zu machen.

Zwischen der relativen elektrophoretischen Mobilität eines Proteins (M_R) und der Acrylamidkonzentration (T) gilt die Beziehung:

$$(7) \quad \log M_R = - K_R T + a$$

(K_R = Retardationskoeffizient und a = Konstante)

Mit nativer 6-MSS-Synthetase wurden Elektrophoresen mit Gelen verschiedener Porengrößen durchgeführt und die relativen, elektrophoretischen Beweglichkeiten der vier gut erkennbaren Proteinbanden bestimmt. Die Auftragung des Logarithmus der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit gegen die Acrylamidkonzentration ergibt einen Satz von Geraden, denen allen ein Punkt gemeinsam ist (Abb. 28). Die Steigung jeder Geraden kann durch ein bestimmtes K_R beschrieben werden.

Für verschiedene Referenzproteine wurden die Retardationskoeffizienten bestimmt und deren Quadratwurzel gegen den nach Gleichung 8 berechneten mittleren Molekülradius (R_m) aufgetragen (56). Die sich ergebende Eichgerade (Abb. 29) ermöglichte die Bestimmung der Molekülradien und damit auch der Molekulargewichte der vier Proteinkomponenten.

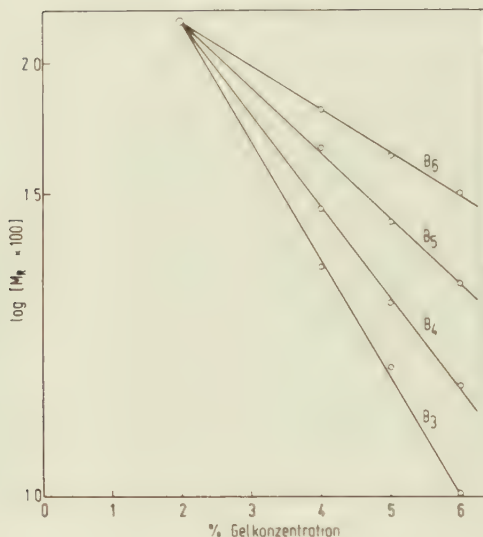


Abb. 28 Elektrophoretische Beweglichkeit der disk-elektrophoretisch unterscheidbaren Proteinkomponenten der 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen.

$$(8) \quad MG = \frac{4 \bar{n} N}{3 V} R_m^3$$

(N = Loschmidt'sche Zahl, V = partielles, spezifisches Volumen 0.74 mg/ml)

Den Banden B3 bis B6 können die Molekulargewichte 340 000, 450 000, 550 000 und 735 000 zugeordnet werden. Offensichtlich entspricht die Bande B3 dem nativen Enzym, während es sich bei den Banden B4 bis B6 um Dissoziationsprodukte des Multienzymkomplexes handelt, von denen B6 - die am weitesten gewanderte Bande - wahrscheinlich eine dimere oder eine stark aufgefaltete monomere Untereinheit und B4 eine trimere Form der 6-MSS-Synthetase darstellen. Die Bande B5

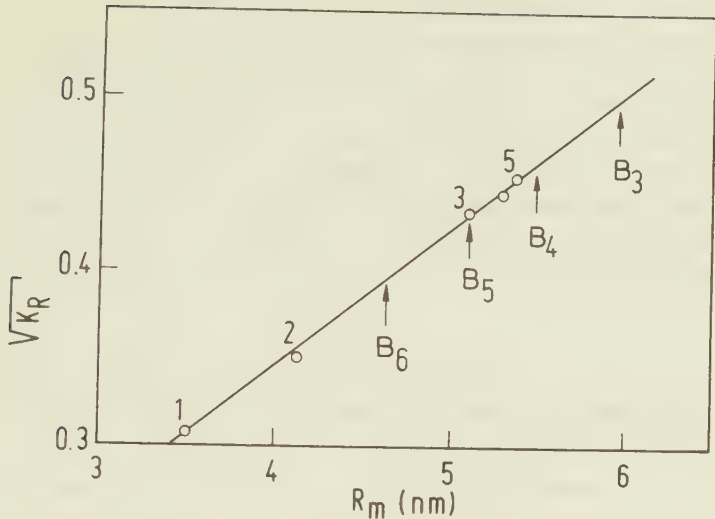


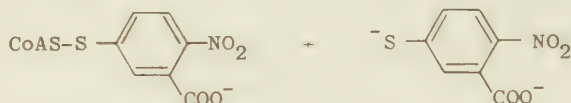
Abb. 29 Eichgerade zur Bestimmung des mittleren Radius (R_m) der disk-elektrophoretisch unterscheidbaren Proteinspezies der 6-MSS-Synthetase.
Eichproteine: (1) Aldolase (160 000), (2) Katalase (235 000), (3) Urease (480 000), β -Galaktosidase (520 000) und (5) Ferritin (540 000).

entspricht eher einer dimeren, als einer weiteren, trimeren Form der 6-MSS-Synthetase.

4. Bestimmung der Zahl von Bindungsstellen für Acetyl-CoA und Malonyl-CoA

Die Substrate der 6-MSS-Synthetase sind Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und NADPH. In der Regel erwartet man für die einzelnen Substrate je eine Bindungsstelle pro Untereinheit, falls diese identisch sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollen sich die Untersuchungen hierzu auf die Bindungsstellen für Acetyl- und Malonyl-CoA beschränken.

Die Anzahl der Bindungsstellen wurde mit der Methode der "active-site"-Titration bestimmt, eine auch bei der Hefe-FS-Synthetase mit Erfolg angewandte Methode (57,58). In Anwesenheit von Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA wird die Synthetase unter gleichzeitiger Freisetzung von Coenzym A acyliert. Die Menge an freigesetztem Coenzym A kann mit Ellman's Reagens bestimmt werden (Gleichung 9 und 10). Die gebildete Menge Thiophenolat entspricht der Menge an titrierten Bindungsstellen.



Diese Methode erfordert jedoch eine grundsätzliche Vorsichtsmaßnahme: Durch anwesendes Ellman's Reagens dürfen keine "Fremdthiole" - seien es Proteinthiole, seien es in Form von Coenzym A oder anderen niedermolekularen Mercaptanen eingeschleppte Thiole - titriert werden. Deshalb wurde die 6-MSS-Synthetase durch Gelfiltration von niedermolekularen Thiolen befreit und dann ebenso wie die Substrate Acetyl-CoA und Malonyl-CoA mit einem hohen Überschuß an Ellman's Reagens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um freigesetztes Thiophenolat abzutrennen, wurden die Substrate über Sephadex G 10 filtriert. Die Titration der mit Ellman's Reagens vorbehandelten 6-MSS-Synthetase mit Acetyl-CoA bzw. Malonyl-CoA wurde bei pH 7.0 durchgeführt, einerseits um noch innerhalb des Stabilitätsbereiches des Enzymkomplexes zu bleiben, andererseits um einer Hydrolyse der alkalilabilen Coenzym A-Derivate entgegenzuwirken. Für die Beladungsversuche wurde ein von Sumper (57) beschriebenes Vier-Küvetten-System ver-

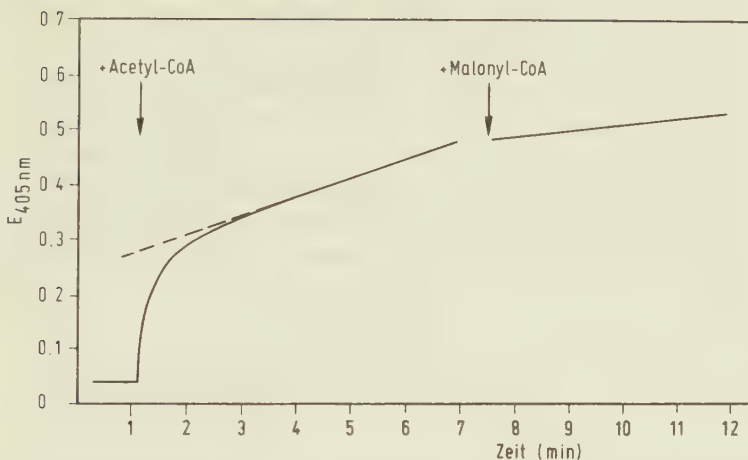


Abb. 30 Titration von DTNB-vorbehandelter 6-MSS-Synthetase (5.6 mg/ml) mit Acetyl-CoA (0.5 mM) und zusätzlich mit Malonyl-CoA (0.5 mM).

wendet, womit Nebenreaktionen eventuell noch vorhandener Fremdthiole mit DTNB kompensiert werden konnten.

Nach den Untersuchungen von Schindlbeck (11) verfügt die 6-MSS-Synthetase über eine Acetyl-Transferase wie auch über eine Malonyl-Transferase mit verschiedenen, aktiven Zentren. Danach sollte unter Beachtung der oben beschriebenen Vorichtsmaßnahmen nach Inkubation der 6-MSS-Synthetase mit Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA eine sehr schnell verlaufende Freisetzung von Coenzym A bzw. Thiophenolat, gefolgt von einer sehr langsamen auf Deacylase-Aktivität zurückzuführende, zeitlineare Extinktionsänderung, zu beobachten sein. Die anschließende Zugabe des anderen Substrats sollte dann nochmals einen Extinktionssprung auslösen. Wie die Abbildungen 30 und 31 zeigen, kann ein Extinktionssprung aber nur bei der Erstbeladung des Enzyms mit einem der beiden Substrate gemessen werden. Die Höhe der Beladung beträgt 3.1 bis 3.8 Acetyl- bzw. Malonylreste je Molekül 6-MSS-Synthetase.

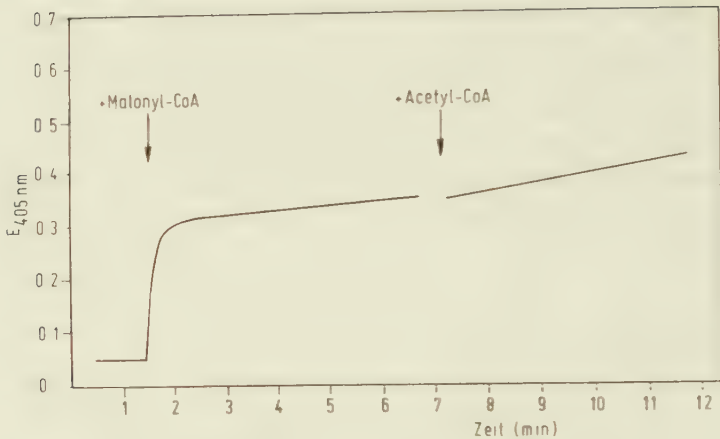


Abb. 31 Titration von DTNB-vorbehandelter 6-MSS-Synthetase (5.6 mg/ml) mit Malonyl-CoA (0.5 mM) und zusätzlich mit Acetyl-CoA (0.5 mM).

Schindlbeck erreichte nach Acylierung des Enzyms mit 1- 14 C-Acetyl-CoA und anschließender Perameisensäure -Oxydation eine Beladung von 1.16 μ Mol pro μ Mol 6-MSS-Synthetase ($MG = 1.3 \times 10^6$).

Die alternative Beladbarkeit der 6-MSS-Synthetase mit Acetat oder Malonat deutet darauf hin, daß unter diesen Versuchsbedingungen die Akzeptorstelle der Acetyltransferase auch mit Malonylresten und umgekehrt die Malonyltransferase mit Acetylresten beladen werden kann. Die Existenz nur einer Transferase, welche sowohl den Acetyl- als auch den Malonyltransfer übernehmen kann, ist bei einer Beladung von 0.7 bis 0.9 Acylresten pro Polypeptidkette nicht ausgeschlossen.

Bemerkenswert ist die deutlich höhere Deacylase-Aktivität nach Acetylierung der 6-MSS-Synthetase, verglichen mit der nach Beladen des Enzyms mit Malonat. Auffällig ist darüber hinaus die nach Acetat-Beladung beobachtete Hemmung der Deacylase-Aktivität durch Malonyl-CoA und umgekehrt die Akti-

vierung durch Acetyl-CoA nach erfolgter Malonat-Beladung, so daß nach sukzessiver Inkubation des Enzyms mit beiden Substraten jeweils eine etwa gleich hohe, von der Reihenfolge der Substratzugabe unabhängige Deacylase-Aktivität resultiert. Denkbar ist, daß die Substrat-abhängige Änderung dieser Enzymaktivität auf einen partiellen Austausch von Enzym- und Coenzym-gebundenen Acylresten zurückzuführen ist. Ein solcher Austausch sollte mit verschiedenen radioaktiv markierten Acylresten nachweisbar sein.

IV. REAKTIVE UND NICHT-REAKTIVE THIOLGRUPPEN DER 6-MSS-SYNTHEASE

Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Enzymsystemen zeigen, welche Bedeutung Thiolgruppen zur Aufrechterhaltung von Struktur und Aktivität zukommt. Einerseits können Sulfhydrylgruppen durch Bildung von Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen; eine Reduktion dieser Disulfide kann zu einer Konformationsänderung und zu einem damit verbundenen Aktivitätsverlust führen (62). Andererseits konnte bei verschiedenen Enzymen die Beteiligung von Thiolgruppen am katalytischen Prozeß nachgewiesen werden. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind die FS-Synthetasen (63-65), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (66), α -Ketosäure-Dehydrogenase (67) und Gramicidin-S-Synthetase (68). Zu dieser Gruppe von Enzymen zählt auch die 6-MSS-Synthetase.

1. Anzahl der Thiolgruppen im Multienzymkomplex

Aufgrund des hohen Molekulargewichts des nativen Enzymkomplexes (790 000) und der Untereinheiten (176 000) ist anzunehmen, daß die 6-MSS-Synthetase eine größere Anzahl von Thiolgruppen enthält, die entsprechend ihrer räumlichen Lage und chemischen Umgebung im Komplex gegenüber Thiol-spezifischen Hemmstoffen unterschiedlich reaktiv sind.

Für die Bestimmung der Proteinthiole verwendeten wir die indirekte Methode der Titration mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)). Im Überschuß reagiert dieses Reagenz quantitativ mit Thiolgruppen nach Gleichung (11). Die Reaktion kann über die Freisetzung des Thiophenolatanions bei 412 nm optisch verfolgt werden (59).

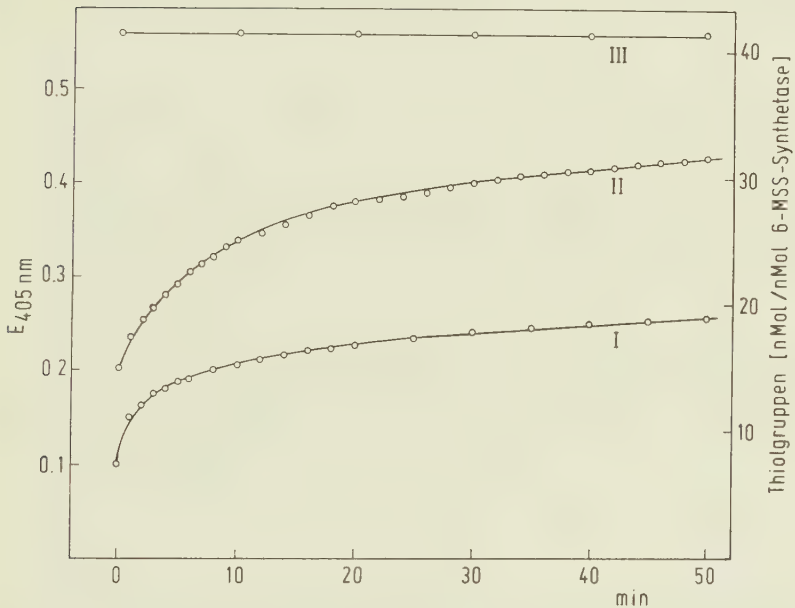
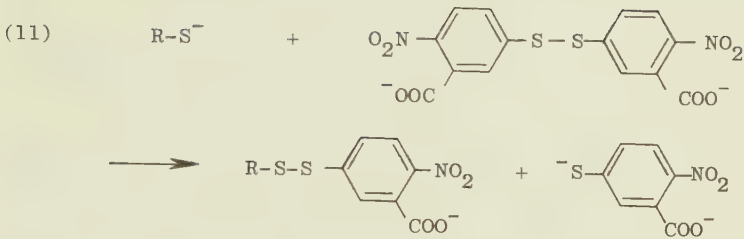


Abb. 32 Titration der Thiolgruppen von nativer und denaturierter 6-MSS-Synthetase mit Ellman's Reagenz (DTNB). "Thioolfreies" Enzym (1 nMol) in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, wurde bei Raumtemperatur mit 10^{-5} M DTNB versetzt und die Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat bei 412 nm verfolgt. (I) natives Enzym, (II) Enzym, das eine Minute vor Zugabe von DTNB mit 1 M Harnstoff versetzt wurde, (III) Enzym, das 15 Minuten vor Zugabe von DTNB mit 8 M Harnstoff denaturiert wurde.

Wegen der schnellen Reaktion des Ellman's Reagens mit SH-Gruppen ist eine Unterscheidung zwischen stark und schwach reaktiven Thiolen im nativen Protein möglich. Abbildung 32 (Kurve I) zeigt, daß bei Inkubation von "thiolfreier" 6-MSS-Synthetase mit Ellman's Reagens in wenigen Sekunden ein Extinktionssprung erfolgt. Die Extinktionsänderung entspricht der Freisetzung von 5 bis 7 Mol Thiophenolatanionen pro Mol 6-MSS-Synthetase. Innerhalb fünf Minuten werden weitere 5 Mol Thiolgruppen titriert. Danach beobachtet man nur noch eine langsame Extinktionszunahme. Offensichtlich wird unter diesen Bedingungen die Synthetase langsam aufgefaltet, wodurch weitere Thiolgruppen dem Angriff durch das Ellman's Reagens ausgesetzt sind.

Mit DTNB behandeltes Enzym verliert vollständig seine katalytische Aktivität. Wird es jedoch mit einem wirksamen Reduktionsmittel (z.B. Dithiothreitol) inkubiert, ist eine Reaktivierung der Gesamtaktivität bis zu 20 % der Ausgangsaktivität möglich. Dies ist ein Hinweis, daß die native Konformation des Multienzymkomplexes weitgehend erhalten bleibt.

Daß noch eine große Zahl von Thiolgruppen geschützt im Inneren des Proteins liegt, zeigt die DTNB-Titration nach Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur mit Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid. Denaturierte 6-MSS-Synthetase läßt sich spontan mit 39 bis 42 Mol Thiophenylresten pro Mol Protein beladen (Abb. 32, Kurve III).

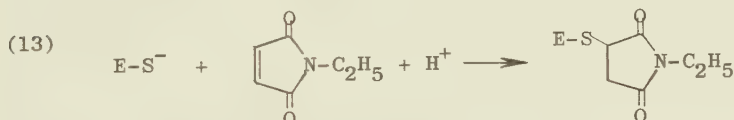
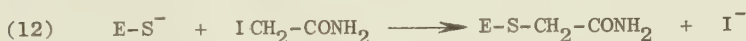
2. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid

Frühe Versuche, die 6-MSS-Synthetase mit Jodacetamid zu inhibieren (5), wiesen darauf hin, daß Thiolgruppen am katalytischen Prozeß beteiligt sind. Weitere Untersuchungen ergaben, daß wie die Hefe-FS-Synthetase auch die 6-MSS-(6,7) und die FS-Synthetase (70) aus *P.patulum* zwei kata-

lytisch aktive Sulphydrylgruppen von unterschiedlicher Spezifität besitzen.

a) Kinetik der Inaktivierung

Die Inkubation "thiolefreier" 6-MSS-Synthetase führt sowohl mit Jodacetamid als auch mit N-Äthylmaleinimid zu einer irreversiblen Hemmung der Gesamtaktivität.



Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid ist in der Abbildung 33 dargestellt.

Unter der Voraussetzung, daß die Hemmung einer Reaktion zweiter Ordnung folgt und die Enzymkonzentration gegenüber der Hemmstoffkonzentration vernachlässigt werden kann, gilt folgende vereinfachte Beziehung:

$$(14) \quad \frac{1}{[\text{J}]} \ln \frac{100}{x} = k t$$

($[\text{J}]$ = Hemmstoffkonzentration, x = Prozent Restaktivität, t = Zeit und k = Geschwindigkeitskonstante)

Diese Voraussetzung ist bei der Hemmung durch Jodacetamid gegeben, wo das molare Hemmstoff-Enzym-Verhältnis 100:1 beträgt. Aus Abbildung 33 läßt sich in guter Übereinstimmung mit Dimroth (6,7) die Geschwindigkeitskonstante $k = 250 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (0° C , pH 7.8) bestimmen.

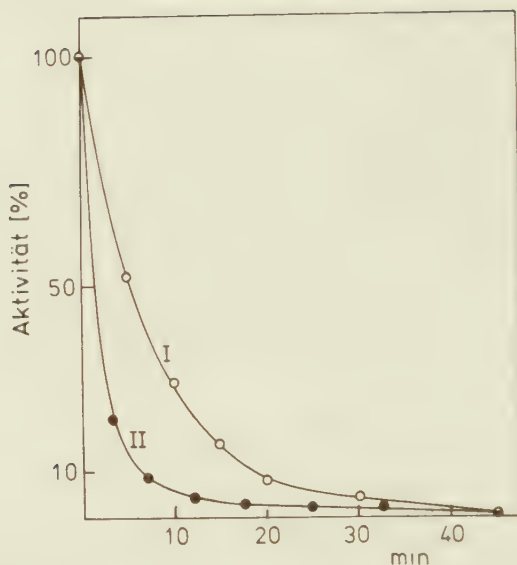


Abb. 33 Kinetik der Inaktivierung von 6-MSS-Synthetase durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid.
Bedingungen: 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 0° C
Kurve I: $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ Jodacetamid
Kurve II: $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ N-Äthylmaleinimid

Um den zeitlichen Verlauf der Enzyminaktivierung durch N-Äthylmaleinimid (Abb. 33) noch erfassen zu können, darf der Hemmstoffüberschuß gegenüber der Enzymkonzentration nicht mehr als das 20- bis 25-fache betragen. Damit ist obige Vereinfachung nicht mehr zulässig und die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten nicht ohne weiteres möglich. Aus diesem Grunde ergibt auch die halblogarithmische Auftragung der Hemmkurve eine deutliche Abweichung von der linearen Beziehung. Nimmt man für die Anfangsgeschwindigkeit einen Hemmstoffüberschuß an, läßt sich eine Geschwindigkeitskonstante $k = 52\,000\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$ (pH 8.0, 0° C) angeben.

b) Hemmbarkeit der Teilaktivitäten durch Jodacetamid
und N-Äthylmaleinimid

Aufgrund eingehender Untersuchungen an der Hefe-FS-Synthetase (63,64,65) und der in dieser Arbeit zwischen beiden Enzymsystemen angenommenen Analogie ist zu erwarten, daß die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Jodacetamid auf die Carboxyamidomethylierung eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum ($= S_C H$) der kondensierenden Teilaktivität zurückzuführen ist. Nach Oesterheld reagiert N-Äthylmaleinimid dagegen sowohl mit der "peripheren" als auch mit der "zentralen" SH-Gruppe der Hefe-FS-Synthetase. Beide Schwefelgifte hemmen daher nur die Kondensation, nicht aber die anderen Teilaktivitäten der FS-Synthetase. Mit entsprechenden Versuchen an der 6-MSS-Synthetase sollte festgestellt werden, ob sich der hemmende Einfluß von Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid gleichfalls nur auf die Kondensationsreaktion der 6-MSS-Synthetase beschränkt.

Da bei der 6-MSS-Synthetase nicht die Möglichkeit einer direkten Bestimmung der kondensierenden Teilaktivität gegeben war, mußte sie indirekt über die Triacetsäurelaktone-Bildung erfolgen. Für die enzymatische Synthese von Triacetsäurelaktone sind aber mindestens drei verschiedene Teilaktivitäten erforderlich, die Acetyl-Transferase, die Malonyl-Transferase und die kondensierende Teilaktivität. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, setzt diese Testanordnung für die Bestimmung der kondensierenden Aktivität vollkommen intakte Transferasen voraus. Wie Schindlbeck (11) zeigen und was von uns bestätigt werden konnte, werden beide Transferasen weder durch Jodacetamid noch durch N-Äthylmaleinimid gehemmt. Da aber die Gegenwart der beiden Hemmstoffe keine Triacetsäurelaktone-Bildung zuließ, mußte eine Hemmung der Synthese im Bereich der kondensierenden Teilaktivität angenommen werden (Tab. 6).

Tab. 6 Hemmung der Teilaktivitäten durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid.
"Thioolfreies" Enzym in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, wurde mit 1 mM Jodacetamid bzw. N-Äthylmaleinimid versetzt, eine Stunde bei 0° C inkubiert und danach die Restaktivität bestimmt.

Enzymaktivität	Restaktivität (%)	
	Jodacetamid	N-Äthylmaleinimid
Gesamtreaktion	4	0
Acetyl-Transfer	94	105
Malonyl-Transfer	105	107
Kondensation (TAL-Bildung)	0	0
Reduktion	32	0
Dehydratisierung	nicht bestimmt	

Im Gegensatz zur Hefe-FS-Synthetase wird - wie der Tabelle 6 entnommen werden kann - bei der 6-MSS-Synthetase auch die Reduktion durch beide Hemmstoffe teilweise bzw. vollständig gehemmt. Daß am katalytischen Prozeß der Reduktion Sulfhydrylgruppen direkt beteiligt sind, ist unwahrscheinlich; denn die 6-MSS-Synthetase kann, wie die Versuche zur Stöchiometrie der Reaktion mit Jodacetamid ergaben (Abschnitt IV.2.e), nur mit e i n e m Carboxyamidomethylrest beladen werden. Offensichtlich bewirkt der Carboxyamidomethylrest eine so weitreichende, konformative Änderung am Enzymkomplex, daß auch der Bereich der Reduktase noch erfaßt wird, was die Abnahme der reduzierenden Teilaktivität erklären könnte.

c) Einfluß von Substraten auf die Inaktivierung

Nach dem hypothetischen Reaktionsschema für die 6-MSS-Synthese wird der Acetatrest über die zentrale auf die periphere SH-Gruppe übertragen, während die zentrale SH-Gruppe mit einem Malonatrest beladen wird. Wenn Jodacetamid mit

der peripheren SH-Gruppe reagiert, wie dies bei der Hefe-FS-Synthetase der Fall ist, müßte sich die 6-MSS-Synthetase durch ausreichend hohe Konzentrationen von Acetyl-CoA vor einer Inaktivierung durch Jodacetamid schützen lassen. Malonyl-CoA sollte keine Schutzwirkung haben.

Abbildung 34 zeigt den deutlichen Schutz von Acetyl-CoA vor Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase bzw. fehlenden Schutz bei Malonyl-CoA. Diese Ergebnisse sprechen für eine Alkylierung der peripheren SH-Gruppe durch Jodacetamid, ohne die Carboxyamidomethylierung weiterer Thiolgruppen ausschließen zu können.

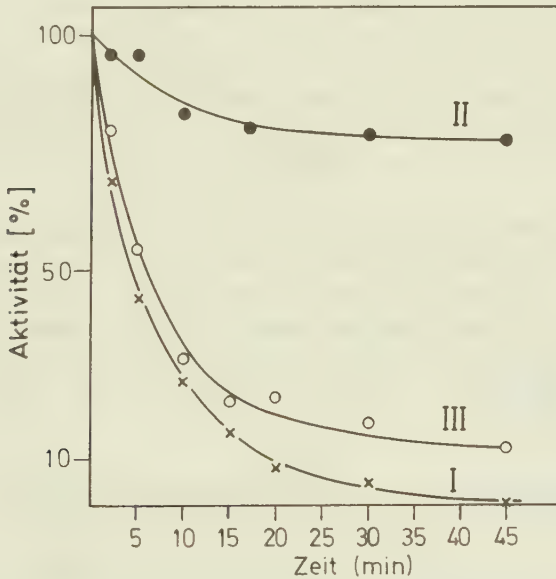


Abb. 34 Schutz der 6-MSS-Synthetase durch Acetyl-CoA vor Hemmung durch Jodacetamid.
Bedingungen: 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 0° C,
5 x 10⁻⁴ M Jodacetamid.
Kurve I: Kontrolle
Kurve II: mit Acetyl-CoA (1 mM)
Kurve III: mit Malonyl-CoA (1 mM)

Tab. 7 Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch N-Äthylmaleinimid
"Thiolfreies" Enzym (1.2 mg/ml) wurde in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, mit den angegebenen Substraten bei 0° C für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von N-Äthylmaleinimid (Endkonzentration 1 mM) wurde die Inkubation für 30 Minuten fortgesetzt und danach die Restaktivität bestimmt.

Vorinkubation	Restaktivität (%)
Kontrolle	0
Acetyl-CoA (1 mM)	35
Malonyl-CoA (1 mM)	2
Acetyl-CoA (1 mM) und Malonyl-CoA (1 mM)	32

Die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch N-Äthylmaleinimid kann gleichfalls mit Acetyl-CoA, nicht aber durch Malonyl-CoA verhindert werden (Tab. 7).

Die Hemmwirkung von N-Äthylmaleinimid ist vergleichbar mit der von Jodacetamid. Die Schutzwirkung von Acetyl-CoA deutet darauf hin, daß beide Hemmstoffe mit der "peripheren" SH-Gruppe reagieren. Das Experiment läßt aber offen, ob der eine oder andere Hemmstoff auch mit der "zentralen" SH-Gruppe reagiert.

d) pH-Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit

Kinetische Untersuchungen an der Hefe-FS-Synthetase (63,64) ergaben, daß am Syntheseprozess Thiolgruppen direkt beteiligt sind. Oesterheldt (64) konnte sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Hemmbarkeit durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid im pH-Bereich von 5 bis 9 unterscheiden. Zu analogen Ergebnissen kam auch Dimroth (6,7) bei der 6-MSS-Synthetase und Holtermüller (70) bei der FS-Synthetase aus *P.patulum*.

Mit dem nach einem neuen Verfahren gereinigten Enzym sollte die pH-Abhängigkeit der Enzyminaktivierung durch Jodacetamid nochmals untersucht werden.

Zur Bestimmung der Inhibierungsgeschwindigkeit durch Jodacetamid wurde die 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Wasserstoffjonenkonzentrationen mit Hemmstoff konstanter Konzentration bei 4° C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten die noch vorhandene Aktivität sofort fluorimetrisch bestimmt. Wie vergleichende Untersuchungen ergaben, konnte wegen der kurzen Testzeiten (maximal 2 Minuten) auf Mercaptanzusätze als Stopplösung verzichtet werden.

Die bei verschiedenen pH-Werten bestimmten Geschwindigkeitskonstanten ergeben einen Kurvenverlauf (Abb. 36), wie man ihn auch bei einer Titration der SH-Gruppe von freiem Cystein findet. Die ermittelte Dissoziationskonstante beträgt

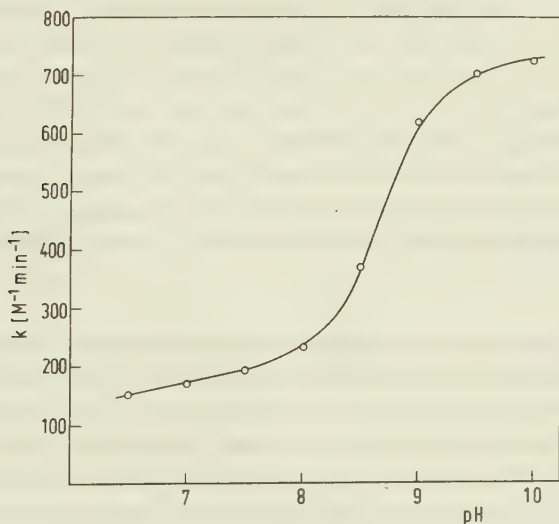


Abb. 35 pH-Abhängigkeit der Hemmung von 6-MSS-Synthetase durch Jodacetamid.
Ausführung siehe experimenteller Teil Seite 130

2.3×10^{-9} M und entspricht damit den in der Literatur angegebenen Werten (71). Eine annähernde pH-Unabhängigkeit für die Geschwindigkeitskonstante beschränkt sich auf den Bereich von pH 6.5 bis 8.0. Hier liegt die Geschwindigkeitskonstante im Mittel bei $k = 200 \text{ M}^{-1} \text{ Min}^{-1}$ (0° C) und damit etwa 250 bis 300 mal höher als die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von freiem Cystein mit Jodacetamid bei 0° C (65). Die erhöhte Reaktivität der durch Jodacetamid hemmbaren Thiolgruppen stützt die Hypothese von einem "präformierten" Thiolanion. Ungeklärt blieb jedoch die von Dimroth beobachtete pH-Unabhängigkeit der 6-MSS-Synthetase-Inhibierung durch Jodacetamid.

e) Anzahl der durch Jodacetamid modifizierbaren Thiolgruppen

Zur quantitativen Bestimmung der durch Jodacetamid modifizierbaren Proteinthiole wurde nach Abtrennen der niedermolekularen Mercaptane die native 6-MSS-Synthetase mit einem etwa 250-fachen Überschuß an ^{14}C -Jodacetamid versetzt und bei 0° C für eine Stunde inkubiert. Durch Gelfiltration, mehrfaches Waschen mit Trichloressigsäure und Wasser wurde das überschüssige Jodacetamid entfernt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Biuretmethode. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde ein Aliquot der Biuretreagens-haltigen Proteinlösung mit Szintillationslösung versetzt und im Szintillations-Spektrometer gezählt.

Die aus zwei Dreifachbestimmungen erhaltenen Beladungen ergaben 1.0 bis 1.3 Carboxyamidomethylreste pro Synthetasmolekül. Über Nacht bei 0° C aufbewahrte, thiolfreie 6-MSS-Synthetase konnte maximal nur noch mit 0.8 Carboxyamidomethylresten beladen werden. Offensichtlich werden die mit Jodacetamid modifizierbaren Thiolgruppen allmählich oxidiert und können dann nicht mehr mit dem Hemmstoff reagieren.

Auffallend ist die hohe Spezifität der Carboxyamidomethylierung. Mit der DTNB-Bestimmungsmethode (Abschnitt IV.1.) fanden wir nach Denaturierung des Multienzymkomplexes 39 bis 42 Thiolgruppen, von denen im nativen Enzym 5 bis 10 Thiole spontan mit dem SH-Reagens reagieren können und damit an der Oberfläche des Enzymmoleküls zu liegen scheinen. Von diesen leicht zugänglichen Proteinthiolen kann aber nur eine SH-Gruppe mit Jodacetamid beladen werden. Gleichzeitig führt die Carboxyamidomethylierung dieser einen SH-Gruppe zum Verlust der 6-MSS-Synthetase-Aktivität. Ob an der Reaktion die Thiolgruppe eines Cysteinrestes beteiligt ist, muß weiteren proteinchemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

3. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch weitere Hemmstoffe

Thiolgruppen sind, wie die Versuche mit Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid beweisen, essentiell für die katalytische Aktivität der 6-MSS-Synthetase. Wir prüften noch einige weitere SH-Gifte auf ihre Fähigkeit, die 6-MSS-Synthetase zu hemmen.

Die in Tabelle 8 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß Jodessigsäure und Silberionen die 6-MSS-Synthetase nur unvollständig hemmen, während in Gegenwart der anderen untersuchten SH-Reagenzien keine Aktivität mehr nachgewiesen werden kann.

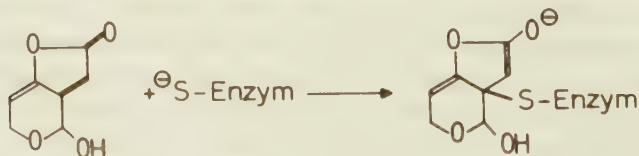
Von den anderen untersuchten Hemmstoffen (Tab. 8) ist die Hemmwirkung von Patulin - dem Endprodukt des sekundären Stoffwechselweges in *P.patulum* -, dessen Vorläufer die Metabolite 6-MSS, m-Kresol, m-Hydroxybenzylalkohol, Gentisylalkohol und Gentisylaldehyd (72,73) sind, bemerkenswert. Die Hemmkinetik ergibt für die Reaktion zwischen 6-MSS-Synthetase und Patulin eine Geschwindigkeitskonstante $k = 210 \text{ M}^{-1} \text{ Min}^{-1}$ (pH 7.8, 0° C) (Abb. 36). Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die von Jodacetamid.

Tab. 8 Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch verschiedene Hemmstoffe
 "Thiolfreie" 6-MSS-Synthetase (1.2 mg/ml) wurde in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, bei 0° C für 30 Minuten mit den angegebenen Reagentien (Endkonzentration 1 mM) inkubiert und danach die Restaktivität bestimmt.

Hemmstoff	Restaktivität (%)
Jodacetamid	0
Jodessigsäure	78
5,5'-Dithio-bis-(2-Nitro-benzoesäure)	0
p-Chlor-mercuri-benzoat	0
Ag ⁺	60
N-Äthylmaleinimid	0
N-(1-Anilinonaphthyl-4)maleinimid	0
N-(p-(2-Benzimidazolyl)phenyl)-maleinimid	0
1-Anilinonaphthyl-8-sulphonat	54
N-α-p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon	69
p-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon	13
Phenylmethansulfonylfluorid	100
Pyridoxal-5'-Phosphat	13
Patulin	8

Die Untersuchungen an der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase, Laktat-Dehydrogenase (74) und an der Aldolase (75) beide aus Kaninchenmuskel lassen vermuten, daß Proteinthiole an der Reaktion beteiligt sind, wobei nach Gleichung 15 auf die Doppelbindung des α,β-ungesättigten Laktons ein nukleophiler Angriff erfolgt.

(15)



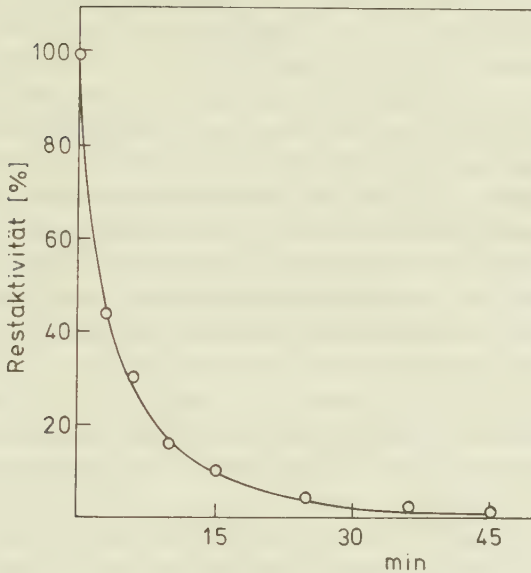


Abb. 36 Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Patulin.
Bedingungen: "Thiolfreies" Enzym (1.8 mg/ml) in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 0° C, 1 mM Patulin.

Tab. 9 Einfluß von Patulin auf die Teilaktivitäten der 6-MSS-Synthetase.
"Thiolfreies" Enzym in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, wurde mit 1 mM Patulin versetzt, eine Stunde bei 0° C inkubiert und danach die Restaktivität bestimmt.

Enzymaktivität	Restaktivität (%)
Gesamtreaktion	3
Acetyl-Transfer	100
Malonyl-Transfer	97
Kondensation (TAL-Bildung)	4
Reduktion	65
Dehydratisierung	nicht bestimmt

Ist die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Patulin auf eine Reaktion mit den katalytisch aktiven Thiolgruppen zurückzuführen, sollten wie bei der Hemmung mit Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid die Triacetsaurelaktone-Bildung und die Reduktase davon betroffen sein. Gleichermaßen ist eine Schutzwirkung durch Acetyl-CoA zu erwarten. NADPH sollte dagegen keinen Einfluß auf die Inaktivierung haben. Die Untersuchungen hierzu bestätigen, daß die Triacetsaurelaktone-Bildung vollständig, die Reduktase aber nur teilweise gehemmt werden, während die Transferasen unbeeinflußt bleiben (Tab. 9). Die Patulin-Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch Vorinkubation des Enzyms mit Substraten zu schützen, war mit Acetyl-CoA und Malonyl-CoA nur beschränkt möglich (Tab. 10).

Die unvollständige Schutzwirkung der Substrate - wie sie auch bei den Hemmversuchen mit N-Äthylmaleinimid beobachtet wurde - könnte auf eine Modifizierung weiterer Thiolgruppen am Enzym, die jedoch nicht direkt am katalytischen Prozeß beteiligt sind, zurückzuführen sein. Ob eine derartige indirekte Ein-

Tab. 10 Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch Patulin

"Thiolfreies" Enzym (1.6 mg/ml) in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, wurde mit den angegebenen Substraten bei 0° C für 10 Minuten vorinkubiert. Nach Zugabe von Patulin (1 mM bzw. 10 mM) wurde die Restaktivität bestimmt.

Vorinkubation mit Substrat (mM)	Inkubation mit Patulin (mM)	Inkubations- zeit mit Patulin (min)	Restaktivität (%)
Kontrolle	1	45	1
Acetyl-CoA (1)	1	45	53
Malonyl-CoA (2)	1	45	10
NADPH (2)	1	45	0
Kontrolle	10	30	0
Acetyl-CoA (1)	10	30	15
Malonyl-CoA (2)	10	30	0
Acetyl-CoA (1) und Malonyl-CoA (2)	10	30	7

flußnahme bei der Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch Patulin vorliegt, müßte proteinchemisch gezeigt werden.

Wie Vogel (72) zeigen konnte, kann bereits in den frühen Wachstumsphasen des Schimmelpilzes Patulin im Kulturmedium nachgewiesen werden. Es ist denkbar, daß die Zellen diesen Metaboliten - vermutlich in Vakuolen eingeschlossen - in vergleichbar hohen Konzentrationen enthalten, der beim Zellaufschluß freigesetzt wird und die 6-MSS-Synthetase inaktivieren könnte. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich ist, vermag Dithiothreitol die 6-MSS-Synthetase nicht nur vor Oxydation, sondern auch vor einer Inaktivierung durch evtl. anwesendes Patulin zu schützen. β -Mercaptoäthanol zeigt dagegen keinen Schutzeffekt. Auch eine Inkubation von Patulin bei höheren Temperaturen führt nicht zu einer Inaktivierung von Patulin.

Tab. 11 Hemmung der Patulin-Aktivität

Patulin (Endkonzentration 1 mM) wurde mit β -Mercaptoäthanol bzw. Dithiothreitol versetzt, bzw. ohne Mercaptanzusatz auf 95 °C erhitzt, danach eine Stunde mit 6-MSS-Synthetase bei 0 °C inkubiert und dann die Restaktivität bestimmt.

Reagens (mM)		Inkubations- temperatur (°C)	Restaktivität (%)
ohne (Kontrolle)		0	14
β -Mercaptoäthanol	10	0	14
	5	0	16
	1	0	28
Dithiothreitol	10	0	110
	5	0	74
	1	0	35
ohne	-	95 (15 min)	16
	-	95 (30 min)	21
	-	95 (60 min)	22

V. DISSOZIATION DES MULTIENTZYMKOMPLEXES MIT LITHIUMCHLORID UND REKONSTITUTION ZUM AKTIVEN ENZYM

1. Vorbemerkung

Weitgehende Schlüsse über Aufbau und Stabilität des Multientzymkomplexes und seiner Teilenzyme, sowie Hinweise auf strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Multientzymsystemen können durch Zerlegen des Multientzymkomplexes in seine Untereinheiten und durch Rekonstitution des gespaltenen Komplexes zum nativen Enzym erhalten werden.

Bei den bisherigen Spaltversuchen mit Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid oder durch pH-Änderungen wurde offensichtlich auch die Tertiärstruktur der Polypeptidketten so stark geschädigt, daß eine Rekonstitution nicht mehr möglich war. Bei der Hefe-FS-Synthetase ergaben sich ähnliche Schwierigkeiten (76,77). Durch wiederholtes Einfrieren bei -70°C und Auftauen einer salzhaltigen FS-Synthetase-Lösung gelang es Sumper (57), den Multientzymkomplex zu dissoziieren und nach Verringerung der Salzkonzentration ihn wieder zu rekonstituieren. Nach einer entsprechenden Behandlung der 6-MSS- und der FS-Synthetase aus *P. patulum* (8) waren noch 40 % der 6-MSS- und 50 % der FS-Synthetase-Aktivität vorhanden. Die LiCl-behandelte 6-MSS-Synthetase konnte teilweise renaturiert werden.

2. Kinetik der Inaktivierung und der Reaktivierung

Glycerin- und Ammoniumsulfat-freie Enzymlösung in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, mit einer Proteinkonzentration von etwa 5 mg/ml und 10 mM Dithiothreitol wurde mit 1 M LiCl versetzt und dreimal für 15 Minuten mit Trockeneis eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut. Bereits der erste Einfrier- und Auftauvorgang führte zu einer Abnahme der Ge-

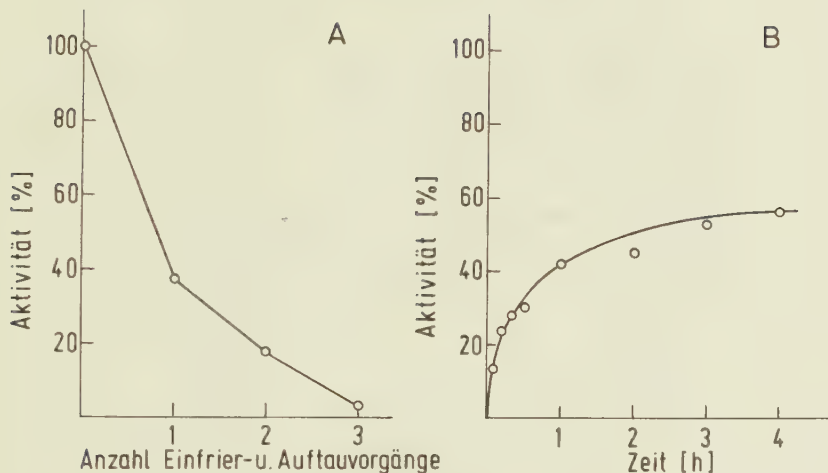


Abb. 38 Reversible Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase in 1 M LiCl.

A: Die Inaktivierung erfolgte durch wiederholtes Einfrieren (-70°C) und Auftauen (23°C) einer 1 M LiCl-haltigen Enzymlösung (4 mg/ml). Puffer: 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8.

B: Zur Reaktivierung der inaktivierten 6-MSS-Synthetase wurde das LiCl durch Gelfiltration entfernt und gleichzeitig die Enzymlösung auf 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, äquilibriert. Die Reaktivierung wurde durch Inkubation der Proteinslösung bei 25°C gestartet.

Alle Puffer waren Glycerin-frei und enthielten 1 mM EDTA und 10 mM Dithiothreitol.

samtaktivität von mehr als 60 % (Abb. 38 A). Nach weiteren zwei Einfrier- und Auftauvorgängen war die 6-MSS-Synthetase-Aktivität auf etwa 3 % Restaktivität gesunken. Nach Verdünnen der salzhaltigen Enzymlösung mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, mit 10 mM Dithiothreitol oder nach Gelfiltration über Sephadex kehrte während der Inkubation bei 25°C die Aktivität zurück und erreichte nach vier Stunden etwa 60 bis 65 % der Ausgangsaktivität (Abb. 38 B).

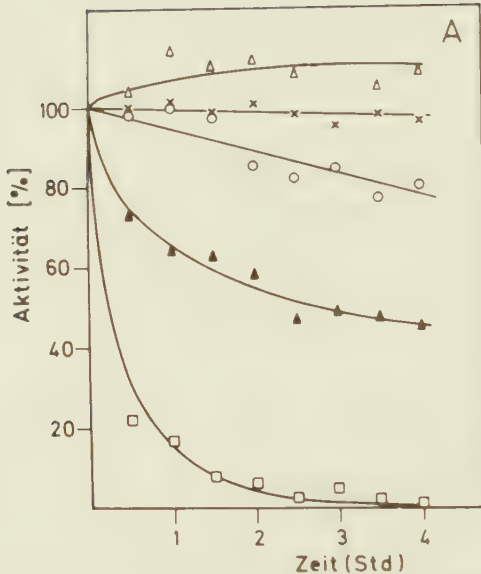


Abb. 39 Reversible Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase in 2 M LiCl.
Die Inaktivierung erfolgte durch Inkubation einer 2 M LiCl-haltigen Enzymlösung (4 mg/ml) bei 0° C. Der 0.1 M Tris-HCl-Puffer war frei von Glycerin und Ammoniumsulfat und enthielt 10 mM Dithiothreitol. (□-□-□) Gesamtaktivität, (▲-▲-▲) Triacetsäure-lakton-Bildung, (○-○-○) Reduktase, (x-x-x) Malonyltransferase und (Δ-Δ-Δ) Acetyl-Transferase.

Eine genauere Untersuchung ergab, daß die Aktivität der nativen Enzymlösung gegenüber der LiCl-haltigen 20 bis 25 % höher lag. Da die langsame Zugabe von LiCl zur Enzymlösung weder zu einer Temperatur- noch zu einer pH-Wertänderung führt, ist der Aktivitätsverlust allein dem zugesetzten Salz zuzuschreiben. Inkubiert man 6-MSS-Synthetase mit höheren LiCl-Konzentrationen, erreicht man z.B. mit 2 M LiCl bei 0° C nach 3 bis 4 Stunden eine nahezu vollständige Inaktivierung des Enzyms (Abb. 39). Auch mit dieser Versuchsanordnung

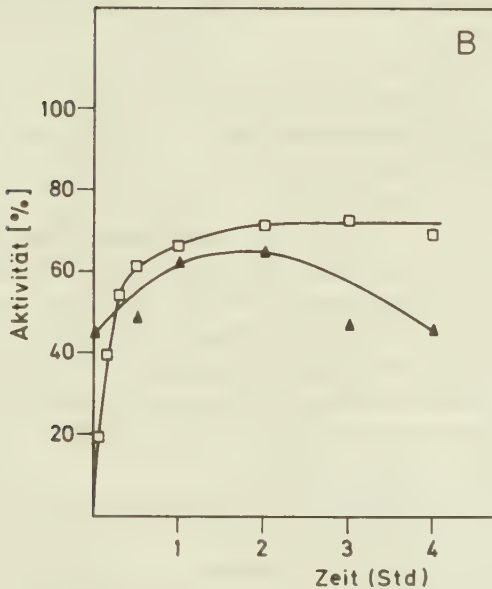


Abb. 40 Reaktivierung der mit 2 M LiCl gespaltenen 6-MSS-Synthetase.
Durch Gelfiltration wurde LiCl entfernt und die Enzymlösung mit 0.1 M Phosphat, pH 7.8, und 10 mM Dithiothreitol äquilibriert. Die Reaktivierung wurde durch Inkubation der Enzymlösung bei 20° C gestartet.
(□-□-□) Gesamtaktivität und (▲-▲-▲) Triacetylacton-Bildung.

können nach Verringerung der hohen Salzkonzentration und Äquilibrieren der Enzymlösung mit 0.1 M K-Phosphat durch Inkubation bei 20° C bis zu 75 % der ursprünglichen 6-MSS-Synthetase-Aktivität zurückgewonnen werden. Wegen der hohen LiCl-Konzentration ist eine reversible Inaktivierung des Multienzymkomplexes nur in Phosphat- und Sulfat-freien Pufferlösungen möglich. Zur Reaktivierung läßt sich das Salz durch Gelfiltration entfernen. Um die Bildung eines Li-Phosphat-Niederschlags und eine dadurch verursachte

irreversible Proteindenaturierung zu vermeiden, empfiehlt sich für die Gelfiltration mit Tris-Puffer aquilibriertes Sephadex. Zur Reaktivierung wird die LiCl-freie Enzymlösung mit Phosphat versetzt.

Bemerkenswert ist, daß Hefe-FS-Synthetase mit 2 M LiCl bei 0° C keinen Aktivitätsverlust erleidet, was für eine höhere Stabilität des Hefe-Enzyms spricht.

Die enzymatische Synthese der 6-MSS durch den Multienzymkomplex setzt intakte Teilenzyme und deren koordiniertes Zusammenwirken voraus. Die Inaktivierung durch LiCl kann daher auf den Verlust einer oder mehrerer Teilaktivitäten und/oder auf eine partiell oder vollständig veränderte Struktur des Multienzymkomplexes, die ein Zusammenwirken noch intakter Teilenzyme verhindert, zurückgeführt werden.

Mit Hilfe von Modellsubstraten können einige der Teilaktivitäten unabhängig voneinander untersucht werden. Dazu gehören die Acetyl- und die Malonyltransferasen, die Reduktase und die Dehydratase. Der Einfluß von LiCl auf die beiden Transferasen und die Reduktase wurde über vier Stunden verfolgt (Abb. 39). Keine der Teilaktivitäten wurde aber so stark inaktiviert, daß damit der Verlust der Gesamtaktivität erklärt werden könnte. Für die Kondensation konnte bisher kein geeignetes Modellsubstrat gefunden werden. Nach Dimroth (6,7) katalysiert aber die 6-MSS-Synthetase in Abwesenheit von NADPH die Bildung von Triacetsäurelaktone, wofür außer der kondensierenden Teilaktivität auch intakte Acetyl- und Malonyl-Transferasen erforderlich sind (Abb. 41). Unter dieser Voraussetzung kann die Geschwindigkeit der Triacetsäurelaktone-Bildung als Maß für die kondensierende Teilaktivität angesehen werden. In Gegenwart von 2 M LiCl nimmt die Triacetsäurelaktone-Bildung etwa 60 % ab (Abb. 39). Dies muß nicht zwingend mit einer Konformationsänderung des kondensierenden Enzyms verbunden sein. Es ist durchaus möglich, daß die kondensierende Teilaktivität ebensowenig

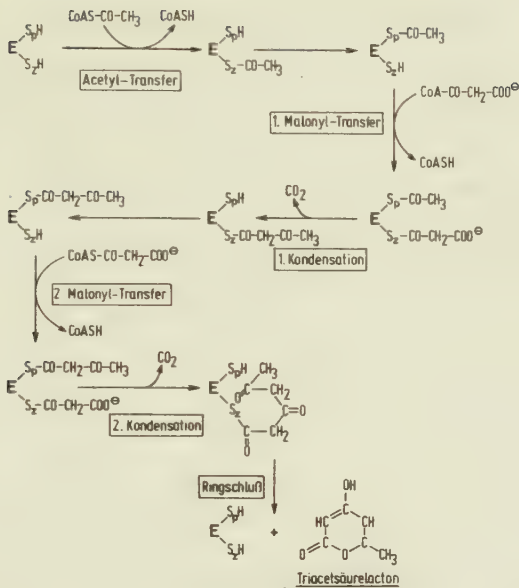


Abb. 41 Hypothetisches Schema der Triacetsäurelaktone-Bildung.

wie die anderen Teilaktivitäten durch LiCl geschädigt wird. Denkbar ist, daß die einzelnen Teilenzyme so weit voneinander wegrücken, daß der Schwingarm 4'-Phosphopantethein die aktiven Zentren nur noch mühsam oder z.T. überhaupt nicht mehr erreicht, so daß sowohl die Triacetsäurelaktone- als auch die 6-MSS-Bildung verlangsamt bzw. unterbrochen werden.

Nicht untersucht werden konnten die Teilaktivitäten, welche die Dehydratisierung, die Cyclisierung der C₈-Kette und die Hydrolyse der enzymgebundenen 6-MSS katalysieren.

Verfolgt man die Inaktivierungskinetik, gehorcht die Inaktivierung der 6-MSS- und der Triacetsäurelaktone-Synthese nicht einfach einer Reaktion erster Ordnung, sondern verläuft biphasisch (Abb. 42). Die Inaktivierung scheint damit über eine oder mehrere Zwischenstufen zu erfolgen.

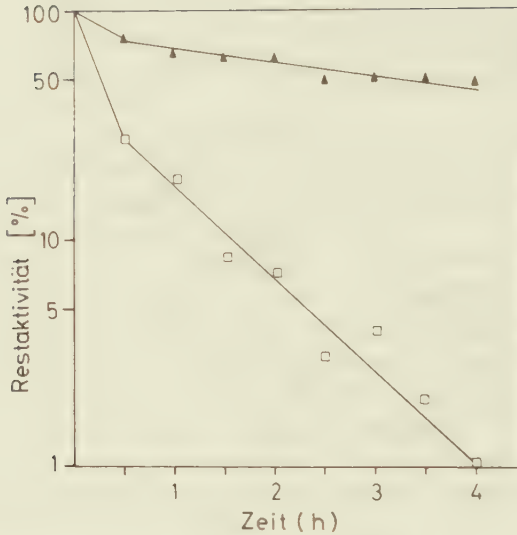


Abb. 42 Inaktivierung LiCl-gespaltener 6-MSS-Synthetase
Halblogarithmische Darstellung der Reaktivierungskinetik.
(□-□-□) Gesamtaktivität und (▲-▲-▲) Triacetsäurelaktone-Bildung.

Die Reaktivierungskinetik wurde für die Gesamtaktivität und die Geschwindigkeit der Triacetsäurelaktone-Bildung aufgenommen (Abb. 40). Die 6-MSS-Synthesefähigkeit kehrt unter optimalen Reaktivierungsbedingungen schon nach wenigen Minuten zurück und erreicht nach etwa zwei Stunden 60 bis 70 % der Ausgangsaktivität. Die Triacetsäurelaktone-synthetisierende-Aktivität durchläuft während der Reaktivierung nach zwei Stunden ein Maximum und sinkt dann wieder auf den Ausgangswert. Welche Bedeutung diesem Kurvenverlauf zukommt, kann aufgrund eines einmal durchgeführten Versuchs nur schwer beurteilt werden.

3. Dissoziation und Rekonstitution des Multienzymkomplexes

6-MSS-Synthetase verliert in Gegenwart hoher LiCl-Konzentrationen die Fähigkeit zur 6-MSS-Synthese. Wie die vorausgegangenen Versuche zeigen, werden die verschiedenen Teilaktivitäten partiell oder überhaupt nicht inaktiviert. Es soll daher geprüft werden, ob der Aktivitätsverlust mit einer Änderung der Quartärstruktur des Multienzymkomplexes einhergeht. Methodisch lassen sich solche strukturellen Änderungen eines Proteins durch eine Abnahme der Sedimentationskonstanten, durch eine erhöhte Reaktivität verschiedener funktioneller Gruppen von Aminosäureseitenketten und durch eine Änderung im optischen Verhalten erkennen.

Von nativer, LiCl-behandelter und reaktivierter 6-MSS-Synthetase wurden Sedimentationsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt. Um die aus verschiedenen Versuchen ermittelten Sedimentationskonstanten besser miteinander vergleichen zu können, wurden LiCl-freie und mit LiCl versetzte Proben nach einer vierstündigen Inkubationsdauer durch Gelfiltration entsalzt und bis zum Füllen der Rotorzellen weiter bei 0° C aufbewahrt. Ebenso wurde inaktiviertes Enzym über eine Sephadex-Säule, die jedoch mit Phosphat- statt mit Tris-Puffer äquilibriert war, entsalzt und danach 4 Stunden bei 20° C reaktiviert. Die optische Dichte der Proteinlösungen wurde eine Stunde vor dem Sedimentationslauf auf 0.7 eingestellt.

Das Sedimentationsverhalten von nativer und renaturierter 6-MSS-Synthetase läßt keinen Unterschied erkennen (Abb. 43 A und C). Die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch LiCl ist mit einer Veränderung des Sedimentationsverhaltens des Multienzymkomplexes verbunden (Abb. 43 B). Die Auswertung der Sedimentationsläufe (Tab. 12) zeigt, daß die LiCl-Behandlung heterogene Spaltprodukte mit den Sedimentationskoeffizienten 7 S, 10 S und 14 S liefert, wohingegen die 20 S-Komponente nicht mehr nachweisbar ist. Der am langsamsten sedimentierenden Proteinkomponenten mit 7 S, deren Anteil

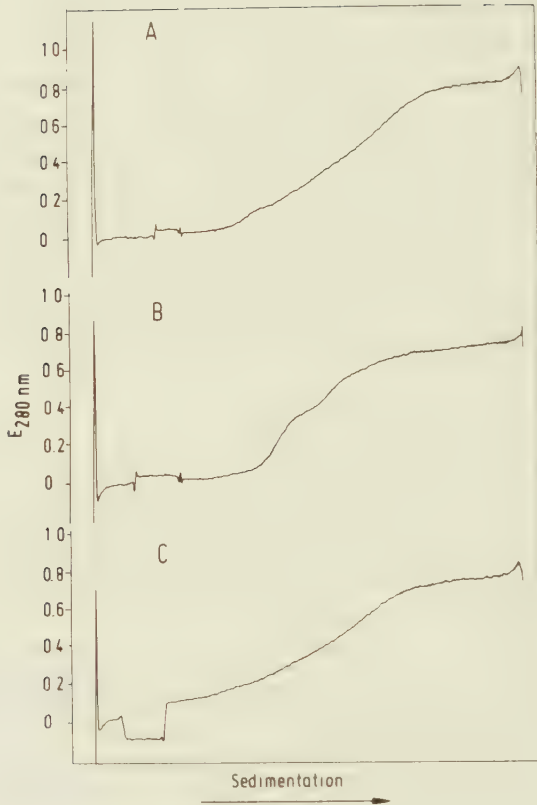


Abb. 43 Änderung des Sedimentationsverhaltens der 6-MSS-Synthetase durch 2 M LiCl.

- A: 6-MSS-Synthetase in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, und 1 mM DTT. Aufnahme 12 Minuten nach Erreichen der maximalen Drehzahl (60 000 Upm, bei 20°C).
- B: Gespaltene 6-MSS-Synthetase (4 Stunden bei 0°C mit 2 M LiCl inkubiert) in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, und 1 mM DTT. Aufnahme 24 Minuten nach Erreichen der maximalen Drehzahl.
- C: Rekonstituierte 6-MSS-Synthetase in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, und 1 mM DTT. Aufnahme 12 Minuten nach Erreichen der maximalen Drehzahl.

Anteil im Spaltgemisch etwa 50 % beträgt, kann ein Molekulargewicht von etwa 150 000 zugeordnet werden. Das mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermittelte Molekulargewicht für die Polypeptidketten der 6-MSS-Synthetase liegt in der gleichen Größenordnung, so daß die 7 S - Komponente die kleinste Untereinheit des Multienzymkomplexes darstellt, die anderen beiden Proteinkomponenten, welche mit 10 S und 14 S sedimentieren, das Dimere bzw. das Trimere der 7 S - Untereinheit.

Hefe-FS-Synthetase (57), aber auch andere Enzymsysteme, z.B. Transcarbamoyl-Transferase (69) zeigen nach Dissoziation in Untereinheiten eine erhöhte Thiolreaktivität. Native und LiCl-gespaltene 6-MSS-Synthetase ließen gegenüber Ellman's Reagens keinen Unterschied in ihrer Reaktivität erkennen. Erst die Gegenwart von 4 M LiCl führte zu einer zusätzlichen Beladung der 6-MSS-Synthetase.

Tab. 12 Auswertung der Sedimentationsläufe von nativer, LiCl-gespaltener und rekonstituierter 6-MSS-Synthetase (Abb. 43 A-C).
Der relative Anteil der einzelnen Proteinkomponenten wurde durch Absorption bei 280 nm bestimmt.

	6 S	7 S	10 S	14 S	20 S
native 6-MSS-Synthetase	15	-	-	-	75
LiCl- gespaltene 6-MSS-Synthetase	-	50	25	15	-
rekonstituierte 6-MSS-Synthetase	15	-	-	-	70

4. Einfluß verschiedener Parameter auf die Inaktivierung und die Reaktivierung

Mit den folgenden Versuchen sollen verschiedene Einflüsse, die eine Inaktivierung verhindern und eine Reaktivierung begünstigen, untersucht werden.

Die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase mit LiCl konnte durch das Puffersystem nicht beeinflußt werden. Eine Reaktivierung gespaltener 6-MSS-Synthetase war jedoch nur in Phosphat- oder Tris-Phosphat-Puffer möglich. In Phosphat-freiem Tris-Puffer konnte nur ein geringer Teil der Gesamtaktivität zurückgewonnen werden. Die zur Reaktivierung notwendigen Phosphationen ließen sich jedoch durch andere zweiwertige Anionen, z.B. Sulfationen, ersetzen (Abb. 44).

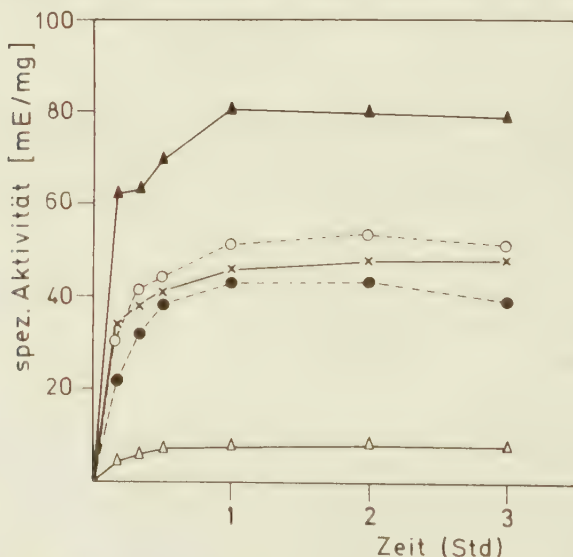


Abb. 44 Reaktivierung LiCl-gespaltener 6-MSS-Synthetase in verschiedenen Puffersystemen. Die Ansätze enthielten 10 mM Dithiothreitol.
 (△-△-△) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, (x-x-x) 50 mM K-Phosphat, pH 7.8, (▲-▲-▲) 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, (●-●-●) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 0.05 M Na₂SO₄ und (○-○-○) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 M Na₂SO₄.

Ausgeprägt ist die Abhängigkeit der Reaktivierung vom pH-Wert und von der Temperatur. Beide Parameter beeinflussen sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Reaktivierung. Eine schnelle und maximale Rückkehr der Gesamaktivität erfolgt zwischen pH 7.5 und 8.5 (Abb. 45).

Das Temperaturoptimum liegt bei 20° C. Unterhalb dieser Temperatur reaktiviert die 6-MSS-Synthetase nur sehr langsam, wohingegen man oberhalb von 20° C eine schneller verlaufende Reaktivierung beobachtet, der jedoch eine zunehmende Hitzedenaturierung entgegenwirkt (Abb. 46).

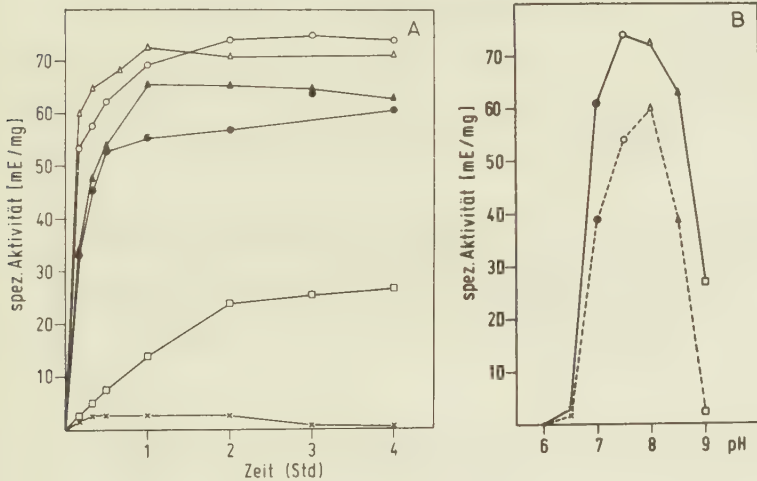


Abb. 45 Reaktivierung LiCl-gespaltener 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen pH-Werten.
A: Zeitabhängigkeit der Reaktivierung bei verschiedenen pH-Werten.
B: pH-Abhängigkeit
durchgezogene Kurve: maximale Reaktivierung nach vier Stunden.
unterbrochene Kurve: Anfangsgeschwindigkeit der Reaktivierung.
(x) pH 6.5, (●) pH 7.0, (o) pH 7.5, (Δ) pH 8.0, (▲) pH 8.5 und (□) pH 9.0.

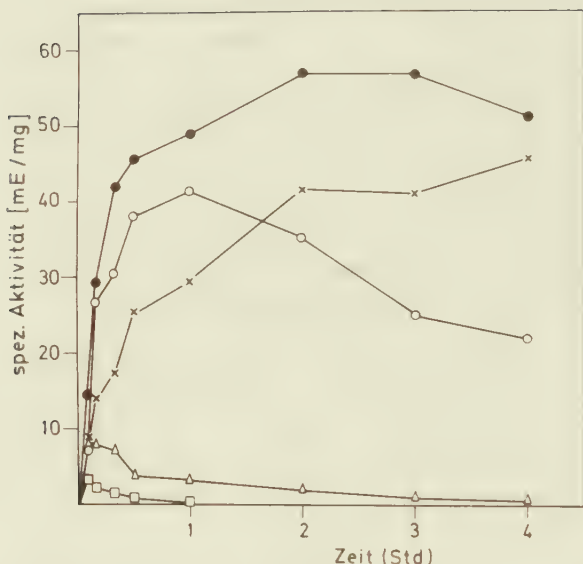


Abb. 46 Reaktivierung der gespaltenen 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Temperaturen.
 Reaktivierungspuffer: 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, und 10 mM Dithiothreitol.
 (x) 15°, (●) 20°, (o) 25°, (Δ) 30° und (□) 35° C.

Aufgrund der bei vielen Enzymen und auch bei der 6-MSS-Synthetase beobachteten stabilisierenden Wirkung von Glycerin ist in dessen Gegenwart sowohl bei der Dissoziation als auch bei der Rekonstitution ein hemmender Einfluß zu erwarten. Hohe Glycerinkonzentrationen im Spaltansatz hemmen tatsächlich die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase (Abb. 47 A). Vermutlich ist darauf auch die von Greull (8) beobachtete, unvollständige Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch LiCl zurückzuführen. Eine Glycerin-bedingte, geringere Reaktivierung konnte auch nur für hohe Glycerin-Konzentrationen gezeigt werden (Abb. 47 B). Niedrige Glycerin-Konzentrationen im Spalt- und Reaktivierungsansatz haben dagegen keinen Einfluß auf die

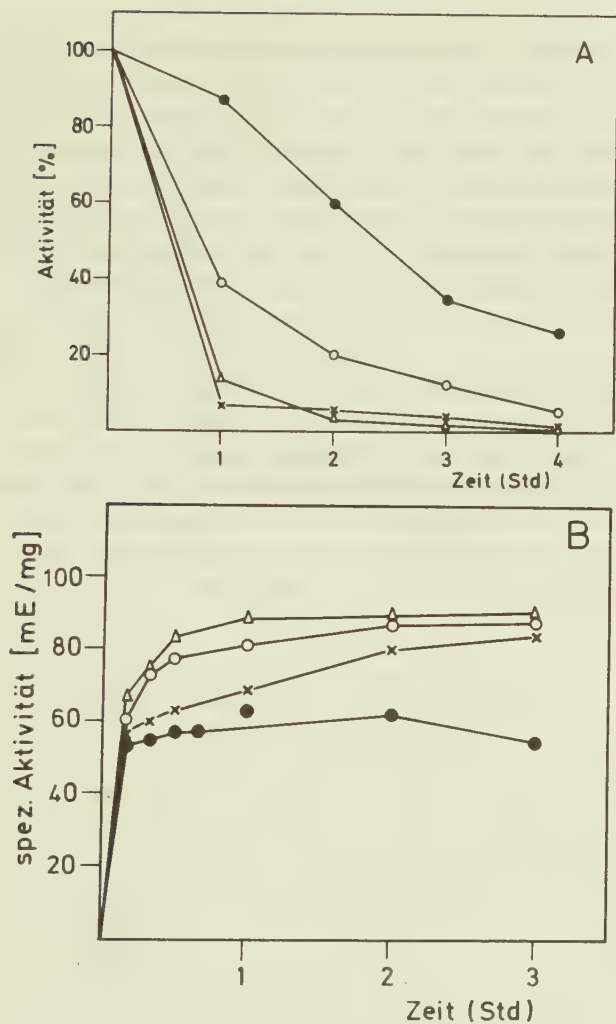


Abb. 47 Inaktivierung (A) und Reaktivierung (B) von 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Konzentrationen Glycerin im Spalt- bzw. Reaktivierungspuffer (0.1 M Tris-HCl bzw. K-Phosphat, pH 7.8 mit 10 mM Dithiothreitol.
(x) 0 %, (Δ) 10 %, (o) 20 % und (●) 40 % Glycerin.

Inaktivierung und Reaktivierung der 6-MSS-Synthetase.

Die Reaktivierung gespaltener 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Konzentrationen Dithiothreitol, einem wirkungsvollen Thiolschutzreagenz, ergab in bezug auf Geschwindigkeit und Endwert der Reaktivierung eine optimale Konzentration von 10 mM Dithiothreitol. Höhere Mercaptankonzentrationen verhinderten eine schnelle und hohe Reaktivierung (Abb. 48).

Abbildung 49 zeigt den Einfluß der Proteinkonzentration auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktivierung im Bereich von 0.1 bis 8.0 mg/ml. Eine genaue Auswertung dieser Kinetiken, die Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reaktivierung erlauben würde, war wegen der starken Streuung der Meßdaten nicht möglich.

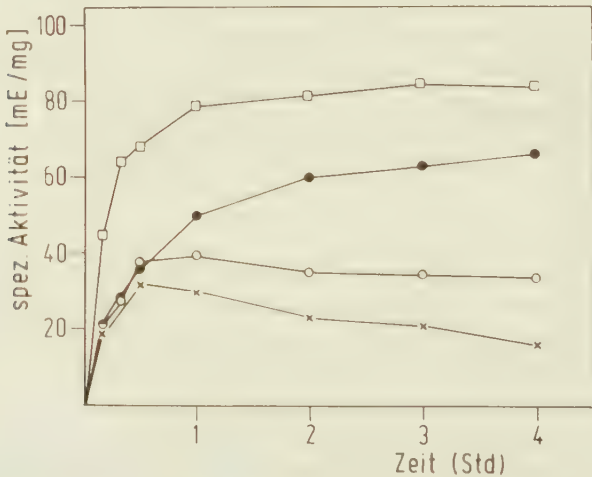


Abb. 48 Reaktivierung gespaltener 6-MSS-Synthetase in Gegenwart verschiedener Dithiothreitol-Konzentrationen. Alle Ansätze enthielten 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8.
(x) ohne, (●) 1 mM, (□) 10 mM und (○) 50 mM Dithiothreitol.

Von verschiedenen Enzymen ist bekannt, daß sie, mit Substrat gesättigt, gegenüber Proteolyse und andersartiger Inaktivierung stabil sind. Beispiele sind die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* IV S (78), Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe (29), Hefe-Phosphofruktokinase (79) und Hefe-Pyruvat-Decarboxylase (80). Die Inkubation der 6-MSS-Synthetase mit den verschiedenen Substraten und Produkten ergab, daß Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, aber auch NADP^+ den Multienzymkomplex vor Inaktivierung schützen. Ohne Schutzwirkung sind NADPH , HCO_3^- und 6-MSS (Tab. 13). Über den Einfluß von Coenzym A kann keine Aussage gemacht werden. Ebenso ausgeprägt ist der Einfluß der Substrate und Produkte auf die Reaktivierung LiCl -gespaltener 6-MSS-Synthetase (Abb. 50). Wiederum sind es Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, welche die Rückkehr der Synthetase-Aktivität beschleunigen und den Endwert erhöhen. Hemmend auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Reaktivierung wirkt 6-MSS.

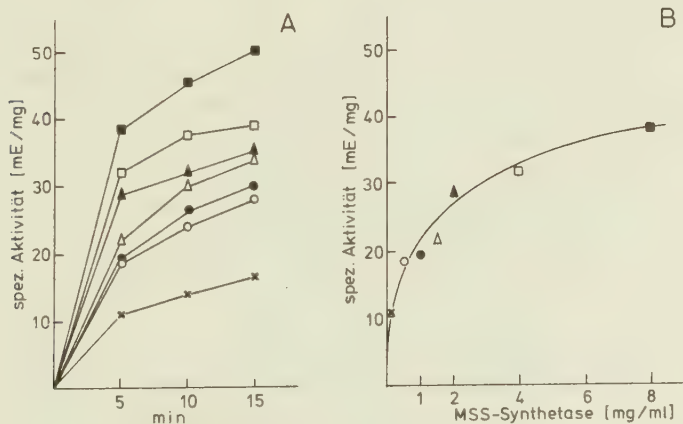


Abb. 49 Reaktivierung LiCl -gespaltener 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Ein Spaltansatz mit einer Proteinkonzentration $c = 8 \text{ mg/ml}$ wurde mit 0.1 M K-Phosphat, $\text{pH } 7.8$, und 10 mM Dithiothreitol entsprechend verdünnt.
(x) 0.1 , (o) 0.5 , (●) 1.0 , (△) 1.5 , (▲) 2.0 ,
(□) 4.0 und (■) 8.0 mg/ml .

Tab. 13 Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase mit 2 M LiCl
in Gegenwart verschiedener Substrate und Produkte
Spaltbedingungen: siehe Seite 131
Vor Zugabe des LiCl's wurde das Enzym mit je 1 mM
der in der Tabelle angegebenen Substrate bzw. Pro-
dukte 15 Minuten inkubiert.

Nr.	Substrat/Produkt	% Aktivität nach	
		10'	30'
1	-	8	0
2	Acetyl-CoA	49	32
3	Malonyl-CoA	30	22
4	NADPH	7	0
5	NADP ⁺	32	14
6	HCO ₃ ⁻	5	0
7	6-MSS	5	0

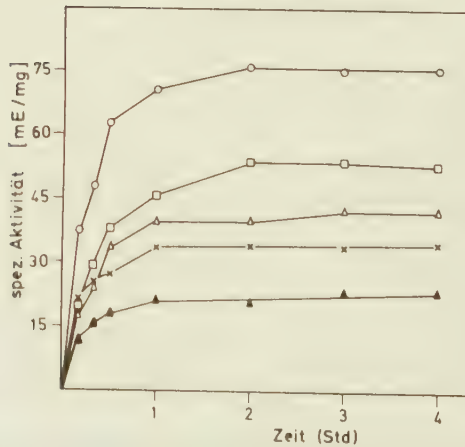


Abb. 50 Reaktivierung LiCl-gespaltener 6-MSS-Synthetase
in Gegenwart von Substraten und Produkten.
(x) ohne Substrat oder Produkt, (o) 1 mM Acetyl-
CoA, (□) 1 mM Malonyl-CoA, (Δ) 1 mM NADPH,
und (▲) 1 mM 6-MSS.

VI. IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER 6-MSS-SYNTHEASE

Bei vielen Enzymsystemen bedeutet der Einsatz immunologischer Methoden eine Ergänzung proteinchemischer und enzymologischer Verfahren, um einen Einblick in die Struktur und Funktion zu erhalten, um ontogenetisch bedingte Veränderungen zu erfassen und um phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen aufzeigen zu können. Teilweise wurden diese Fragen durch die Arbeiten von Hess (81) an der Hefe-FS-Synthetase angegangen. Analoge Untersuchungen an der 6-MSS-Synthetase aus *P.patulum* können dazu einen weiteren Beitrag leisten.

1. Gewinnung und Anreicherung von Anti-6-MSS-Synthetase

Mit einem bis zur Einheitlichkeit gereinigten Enzympräparat von 6-MSS-Synthetase aus *P.patulum* konnten aus dem Blut immunisierter Kaninchen spezifische Anti-6-MSS-Synthetase-Seren gewonnen werden. Die Titerbestimmung nach Ouchterlony ergab für verschiedene Seren Werte zwischen 1:16 und 1:32 (Abb. 51). Die Kaninchen-Antiseren gegen 6-MSS-Synthetase wurden mit Ammoniumsulfat fraktioniert und die γ -Globuline durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt. Mit den gereinigten Immunoglobulinen konnte immunoelektrophoretisch die Einheitlichkeit der 6-MSS-Synthetase gezeigt werden (Abb. 14).

2. Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung der 6-MSS-Synthetase und der FS-Synthetase

Die Ähnlichkeit von Hefe-FS-Synthetase und 6-MSS-Synthetase aus *P.patulum* ist vielfach und auffallend. Es stellt sich die Frage, ob diese Ähnlichkeit durch zunehmende Anpassung an gleiche Funktionen aus ursprünglich unterschiedlich gestalteten Strukturen im Laufe der Evolution sich entwickelt hat oder ob beide Multienzymkomplexe Homologe und damit

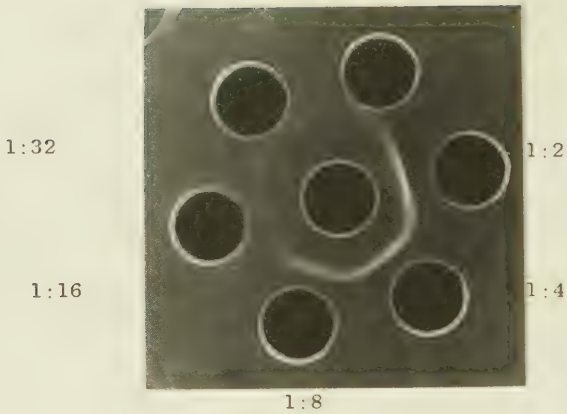
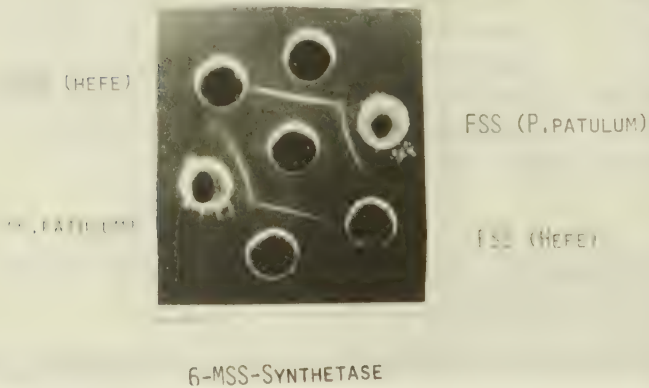


Abb 51 Titerbestimmung des Anti-6-MSS-Synthetase-Serums nach Ouchterlony.

Lochkranz: Anti-Serum im angegebenen Verdünnungsverhältnis

zentrales Loch: 6-MSS-Synthetase (1 mg/ml)

6-MSS-SYNTHETASE



6-MSS-SYNTHETASE

Abb. 52 Immunologischer Vergleich von 6-MSS-Synthetase, FS-Synthetase aus Hefe und *P. patulum*.
zentrales Loch: Anti-6-MSS-Synthetase.

phylogenetisch verwandt sind. Bestehen derartige Verwandtschaftsbeziehungen zwischen beiden Synthetasen, werden sie nicht nur in ihren katalytischen Funktionen, sondern auch in ihrer Struktur eine weitgehende Übereinstimmung aufweisen. In diesem Fall wäre eine immunologische Kreuzreaktion zu erwarten.

Im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony wurden beide Enzyme - 6-MSS-Synthetase aus *P.patulum* und FS-Synthetase aus Hefe - mit Anti-6-MSS-Synthetase auf Kreuzreaktivität geprüft (Abb. 52). Überraschend war das Ausbleiben der erwarteten Kreuzreaktion. Immunologische Vergleichsuntersuchungen können aber nur bei einer positiven Reaktion als Hinweis auf entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaftsbeziehungen angesehen werden. Dieses Ergebnis ließ daher offen, ob beide Synthetasen Analoge und damit phylogenetisch nicht verwandt sind oder ob vielleicht doch eine Homologie gegeben ist, deren Nachweis mit dieser Versuchsanordnung nicht möglich ist. Daß Kreuzreaktivität keine notwendige Bedingung für das Vorliegen von Homologie ist, konnte am Beispiel von Lysozym und α -Lactalbumin gezeigt werden, die aufgrund ihrer bekannten Primärsequenzen als miteinander verwandt angesehen werden dürfen. Ein immunologischer Verwandtschaftsnachweis konnte bisher aber nicht erbracht werden (61). Offenbar können im Laufe einer langen oder besonders raschen Evolution gemeinsame Antigendeterminanten verlorengehen. Je näher aber zwei Proteinspezies miteinander verwandt sind, desto zahlreicher sind auch ihre Gemeinsamkeiten und damit die beiden gemeinsamen Antigendeterminanten. Wenn daher zwischen 6-MSS- und FS-Synthetase eine Kreuzreaktion auftritt, dann am wahrscheinlichsten zwischen den beiden Synthetasen aus demselben Organismus.

Nach einem zur Reinigung der 6-MSS-Synthetase modifizierten Verfahren wurde FS-Synthetase aus *P.patulum* angereichert und im Doppeldiffusionstest auf Kreuzreaktivität mit Anti-6-MSS-Synthetase geprüft (Abb. 52). Tatsächlich kommt es zu einer

deutlichen Präzipitatbildung, d.h. beide Synthetasen haben gemeinsame Antigendeterminanten und können damit als homologe Strukturen angesehen werden.

Die Spornbildung bestätigt, daß es sich bei der 6-MSS-Synthetase und der FS-Synthetase aus *P.patulum* nicht um identische Strukturen handeln kann. Da die zur Antikörpergewinnung verwendeten Kaninchen mit gereinigter, FS-Synthetase-freier 6-MSS-Synthetase immunisiert wurden, ist diese Form der Spornbildung unerwartet und nur damit erklärbar, daß in den immunisierten Tieren Antigendeterminanten freigelegt wurden, die nur bei der FS-Synthetase, nicht aber bei der 6-MSS-Synthetase an der Oberfläche der Multienzymkomplexe lokalisiert sind.

3. Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch spezifische Antikörper

Um den Einfluß spezifischer Antikörper auf die katalytische Aktivität der 6-MSS-Synthetase abschätzen zu können, wurde das Enzym mit steigenden Mengen Anti-6-MSS-Synthetase inkubiert. Ein 20-facher Überschuß an Anti-6-MSS-Synthetase gegenüber der eingesetzten Enzymmenge führte zu einer vollständigen Hemmung der 6-MSS-Synthetase (Abb. 53). Unspezifische γ -Globuline konnten dagegen selbst bei einem 200-fachen Überschuß die 6-MSS-Synthetase nicht hemmen.

Mit zunehmender Antikörperkonzentration nahm auch die Präzipitatbildung zu. Nach Abtrennen des Niederschlages durch Zentrifugation wurde im Überstand eine weitere Abnahme der Gesamtaktivität beobachtet. Da die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase durch Antikörper zwischen zwei und sechzig Minuten zeitunabhängig war, folgt daraus, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht notwendig mit einer Enzyminaktivierung verbunden sein muß.

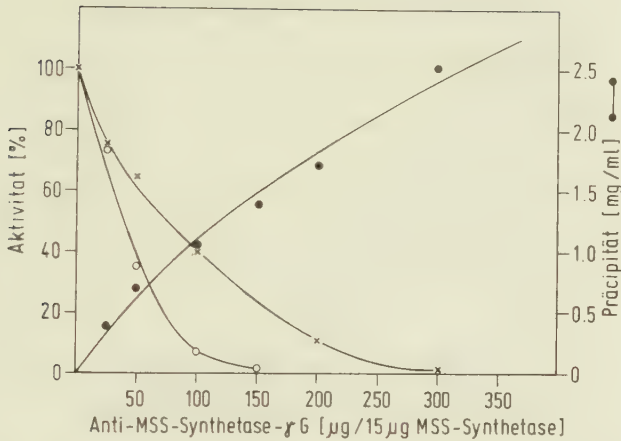


Abb. 53 Einfluß von Anti-6-MSS-Synthetase-Serum auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase.

- (x) 6-MSS-Synthetase-Aktivität nach 15-minütiger Inkubation bei 25° C mit steigenden Mengen Anti-6-MSS-Synthetase.
- (o) 6-MSS-Synthetase-Aktivität nach Abtrennen des präzipitierten Proteins.
- (●) Proteingehalt im Niederschlag. Proteinbestimmung nach der Methode Zillig und Heil (82).

Immunologische Untersuchungen an der Hefe-FS-Synthetase mit spezifischen Antikörpern (81) ergaben eine Abnahme der FS-Synthese-Geschwindigkeit um 75 %. Hess konnte zeigen, daß die Hemmung der Gesamtreaktion mit einer Schädigung der Malonyl-Transferase verbunden ist. Es war naheliegend, eine gleichartige Hemmung auch bei der 6-MSS-Synthetase zu vermuten. Daher wurde zunächst die Malonyl-Transferase untersucht.

Wegen der durch die Antikörper bedingten, hohen Proteinkonzentrationen und auch wegen der teilweise starken Präzipitatbildung mußte auf die radioaktive Aktivitätsbestimmung der Malonyl-Transferase zurückgegriffen werden.

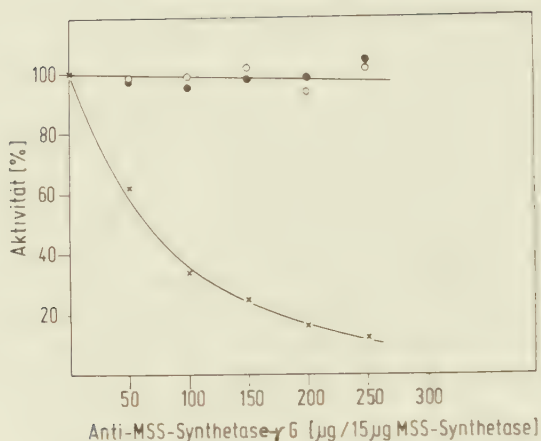


Abb. 54 Einfluß von Anti-6-MSS-Synthetase auf die Acetyl-Transferase (●), die Malonyl-Transferase (○) und die Gesamtaktivität (x).

Weder die Malonyl-Transferase noch die Acetyl-Transferase konnten durch Anti-6-MSS-Synthetase gehemmt werden. (Abb. 54).

Eine direkte Bestimmung der kondensierenden Teilaktivität war bisher nicht möglich. Da aber der Transfer von Acetat und Malonat selbst bei hohen Antikörper-Konzentrationen nicht gehemmt wurde, konnte in Abwesenheit von NADPH die kondensierende Teilaktivität indirekt über die Bildung von Triacetsäurelaktone gemessen werden. Wegen der starken Proteinabsorption bei 278 nm und den sehr hohen Enzym- und Antikörper-Konzentrationen, die im optischen Test erforderlich sind, wurde auch hier der radioaktiven Aktivitätsbestimmung der Vorzug gegeben.

Die Inkubation von 6-MSS-Synthetase mit steigender Antikörper-Konzentration geht mit einer davon abhängigen Abnahme der Triacetsäurelaktone-bildenden Aktivität einher,

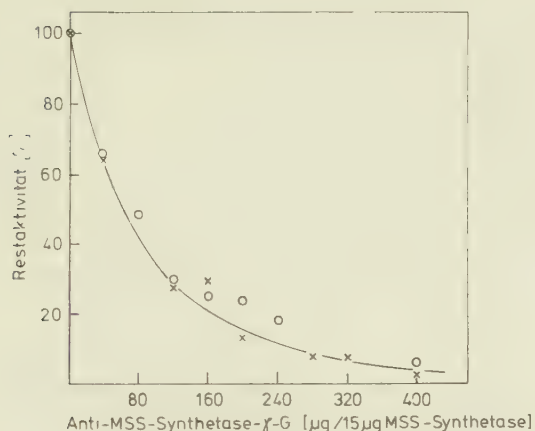


Abb. 55 Einfluß von Anti-6-MSS-Synthetase auf die Triacetyl-säurelaktone-Bildung (o) und die 6-MSS-Synthetase (x).

wie Abbildung 55 zeigt, die bei einem 15-fachen Überschuß an Antikörpern ebenso stark wie die Gesamtreaktion gehemmt wird. Die Triacetsäurelaktone-Bildung setzt in ähnlicher Weise wie die 6-MSS-Synthese ein geordnetes Zusammenwirken verschiedener Teilaktivitäten voraus. Die Hemmung der Laktone-Bildung kann daher verschiedenartig erfolgen. Aufgrund der vorausgehenden Hemmversuche mit Anti-6-MSS-Synthetase kann nur der interne Acyltransfer, die Kondensation oder die Cyclisierung gestört sein.

Von den verbleibenden Teilaktivitäten sollte die Reduktase noch untersucht werden. Auch sie ließ sich mit Anti-6-MSS-Synthetase zumindest partiell hemmen (Abb. 56). Bei einem 15-fachen Antikörperüberschuß erreicht ihr Aktivitätsverlust 65 bis 70 %, während die Gesamtaktivität gleichzeitig auf 8 bis 10 % zurückgeht.

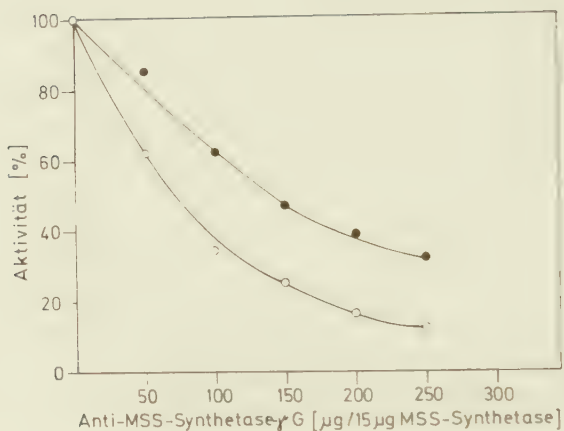


Abb. 56 Einfluß von Anti-6-MSS-Synthetase auf die Reduktase (●) und die Gesamtaktivität (○).

Tab. 14 Einfluß von Anti-6-MSS-Synthetase auf die Teilaktivitäten der 6-MSS-Synthetase.
Die angegebenen Restaktivitäten beziehen sich auf eine 15-minütige Inkubation des Enzyms mit einem 15-fachen Überschuß an Anti-6-MSS-Synthetase.

enzymatische Reaktion	Restaktivität (%)
Gesamtreaktion	8
Acetyl-Transfer	105
Malonyl-Transfer	103
Reduktion	33
Triacetsäurelaktone-Bildung	8

Die Ergebnisse der Experimente zur Hemmung der Gesamt- und Teilaktivitäten der 6-MSS-Synthetase durch Antikörper sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß mindestens zwei der Teilaktivitäten, die Reduktase und die Fähigkeit zur Triacetsäurelaktonebildung, gehemmt werden.

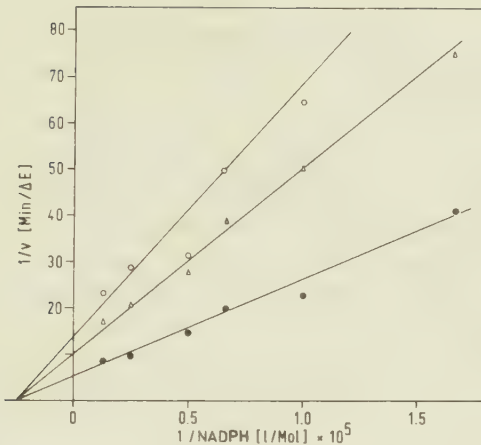


Abb. 57 Hemmung der Gesamtaktivität durch Anti-6-MSS-Synthetase. NADPH-Abhängigkeit der 6-MSS-Synthetase bei verschiedenen Konzentrationen Anti-6-MSS-Synthetase.

- (○) 100 μg Anti-6-MSS-Synthetase/15 μg 6-MSS-Synthetase.
- (△) 75 μg Anti-6-MSS-Synthetase/15 μg 6-MSS-Synthetase.
- (●) ohne Anti-6-MSS-Synthetase.

Um entscheiden zu können, ob die Reduktase durch Anti-6-MSS-Synthetase kompetitiv oder nicht-kompetitiv gehemmt wird, wurde die Gesamtaktivität der 6-MSS-Synthetase abhängig von der NADPH-Konzentration bei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen bestimmt. Die Auswertung der Meßdaten nach der Lineweaver-Burk-Darstellung (Abb. 57) ergibt eine nicht-kompetitive Hemmung. Entsprechend wurde die Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit des Modellsubstrats Triacetsäureester bei zwei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen gemessen. Der ungewöhnlich hohe K_m -Wert ($\sim 10^{-2}$ M) (9) und die limitiert einsetzbare Menge an Modellsubstrat erschwerten die Bestimmung und die Auswertung, so daß bezüglich Triacetsäureester nicht

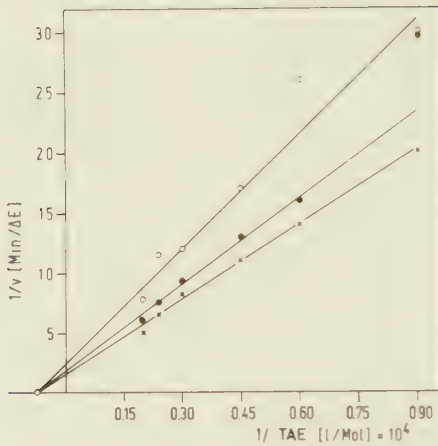


Abb. 58 Hemmung der Reduktase durch Anti-6-MSS-Synthetase. Triacetsäureester-Abhängigkeit bei verschiedenen Konzentrationen Anti-6-MSS-Synthetase.

- (o) 100 μg Anti-6-MSS-Synthetase/ 15 μg 6-MSS-Synthetase.
- (●) 75 μg Anti-6-MSS-Synthetase/ 15 μg 6-MSS-Synthetase.
- (x) ohne Anti-6-MSS-Synthetase.

eindeutig zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmung durch Antikörper entschieden werden konnte.

VII. ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT

1. Fluorimetrische Bestimmung der 6-Methylsalicylsäure

Eine sehr einfache, schnell durchführbare, aber dennoch empfindliche und spezifische Methode der Aktivitätsbestimmung entwickelte Vogel (30) mit dem fluorimetrischen Test, der eine direkte Beobachtung der 6-MSS-Synthese erlaubt. Da dieses Testverfahren in der vorliegenden Arbeit vielfach Anwendung fand, war eine eingehende Untersuchung erforderlich.

6-MSS kann wie viele andere aromatische Kohlenwasserstoffe absorbiertes Licht in Fluoreszenzlicht umwandeln. Das Maximum der Fluoreszenzanregung liegt zwischen 305 und 310 nm, das der Fluoreszenzemission zwischen 408 und 412 nm (Abb. 59). Eine Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzspektren konnte bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M 6-MSS nicht beobachtet werden.

Bei 310 nm werden aber auch andere im Testsystem vorkommenden Verbindungen - Serumalbumin, NADPH, Coenzym A und dessen Acyl-derivate - angeregt (59). Trotz der unterschiedlichen Lage der Fluoreszenzmaxima kommt es zu Überlagerungen der Fluoreszenzbereiche, von denen Serumalbumin und NADPH das Fluoreszenzverhalten der 6-MSS beeinflussen. Da die Konzentration von Serumalbumin sich während der Aktivitätsbestimmung nicht ändert, die von NADPH aber äquimolar zur Bildung von 6-MSS abnimmt, ist es daher zweckmäßig, die Fluoreszenz der 6-MSS bei 390 nm zu messen, wo die des NADPH's noch etwa 15 % beträgt.

Die Fluoreszenzintensität der bei 310 nm angeregten 6-MSS ist sehr niedrig. Deshalb mußten die folgenden Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit mit einem Fluorimeter, das gegenüber herkömmlichen Geräten eine etwa zehnfach höhere Empfindlichkeit aufweist, durchgeführt werden.

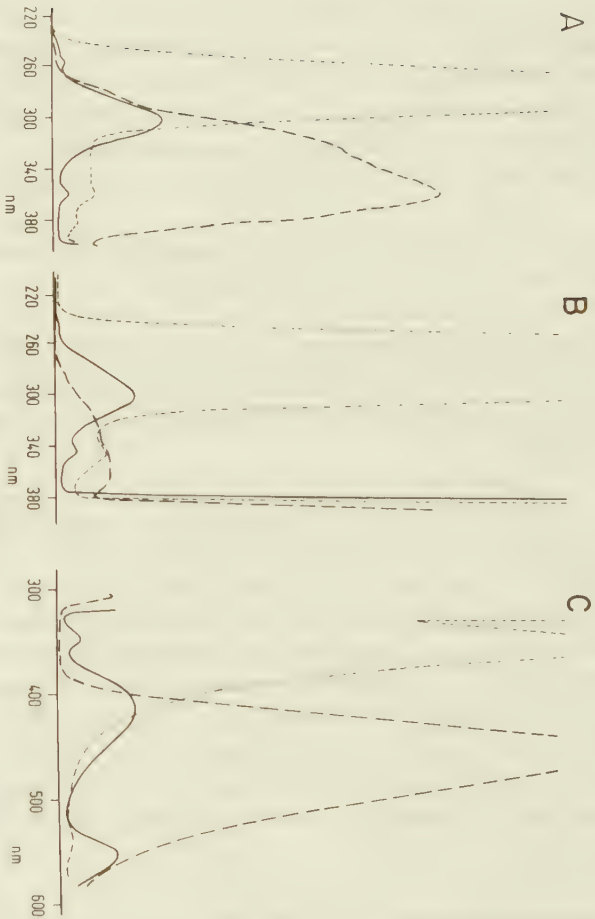


Abb. 59

Fluoreszenzspektren von 6-MSS, NADPH und Serumalbumin
Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8,
mit 50 μ M 6-MSS, 40 μ M NADPH bzw. 18.3 μ M Serumalbumin. Die Spektren
sind nicht korrigiert. Wassertemperatur: 25°C.

A: Anregungsspektren mit der Emissionswellenlänge bei 410 nm
B: Anregungsspektren mit der Emissionswellenlänge bei 390 nm
C: Emissionsspektren mit der Anregungswellenlänge bei 310 nm

— 6-MSS, — NADPH, — Serumalbumin

Im Gegensatz zur Absorptionsmessung, wo relative Intensitäten gemessen werden, beobachtet man bei Fluoreszenzmessungen Intensitätsunterschiede. Um aber die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, wurde die gemessene Fluoreszenz mit Rhodamin B standardisiert und bei der Auswertung die Grundfluoreszenz sowie die Titrations-bedingte Volumenzunahme berücksichtigt.

Abbildung 60 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der 6-MSS-Konzentration. Die Linearität bleibt auch in Gegenwart konstanter Mengen NADPH und/oder Serumalbumin erhalten. Während aber Serumalbumin das Fluoreszenzsignal der 6-MSS verstärkt, verursacht NADPH eine Fluoreszenzlöschung. Die anderen Komponenten im Standardtestsystm haben dagegen keinen Einfluß auf die Fluoreszenz der 6-MSS. Die Fluoreszenzverstärkung bzw. -löschung machte eine Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften von Serumalbumin und NADPH und deren Einflußnahme auf das Fluoreszenzverhalten der 6-MSS notwendig.

Die Anregungs- und Fluoreszenzspektren einer Serumalbuminlösung mit bzw. ohne 6-MSS sind in Abbildung 61 aufgezeichnet. Das Anregungsspektrum einer 6-MSS-haltigen Serumalbuminlösung unterscheidet sich allein durch eine schwach ausgeprägte Schulter auf der längerwelligen Seite des Anregungsgipfels von dem Serumalbumin-Anregungsspektrum. Die Fluoreszenzspektren zeigen ebenfalls ein gemeinsames Maximum bei 325 nm. 6-MSS erzeugt ein Nebenmaximum bei 380 nm, das im Gegensatz zum Fluoreszenzmaximum reiner 6-MSS eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen erfahren hat. Obgleich die von Vogel (30) angegebenen Bedingungen eingehalten wurden, konnten die von ihm aufgenommenen Anregungs- und Fluoreszenzspektren nicht reproduziert werden.

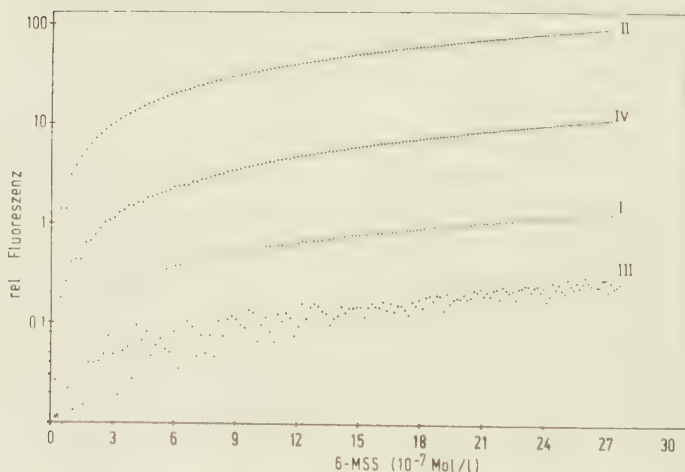
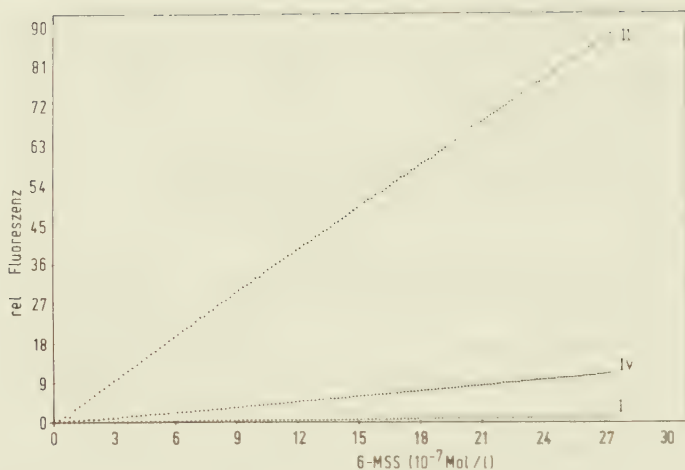


Abb. 60 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der 6-MSS.
 Anregungswellenlänge 310 nm, Emissionswellenlänge 390 nm, Meßtemperatur 25°C, Fluoreszenzstandard: Rhodamin B. Mit einer programmgesteuerten Titrationsautomatik wurde in 150 Schritten die 6-MSS-Konzentration bis 2.75×10^{-6} M erhöht.
 Kurve I: ohne Zusätze
 Kurve II: 1.25 mg/ml Serumalbumin
 Kurve III: 200 μ M NADPH
 Kurve IV: 1.25 mg/ml Serumalbumin und 200 μ M NADPH
 Untere Abbildung: halblogarithmische Darstellung

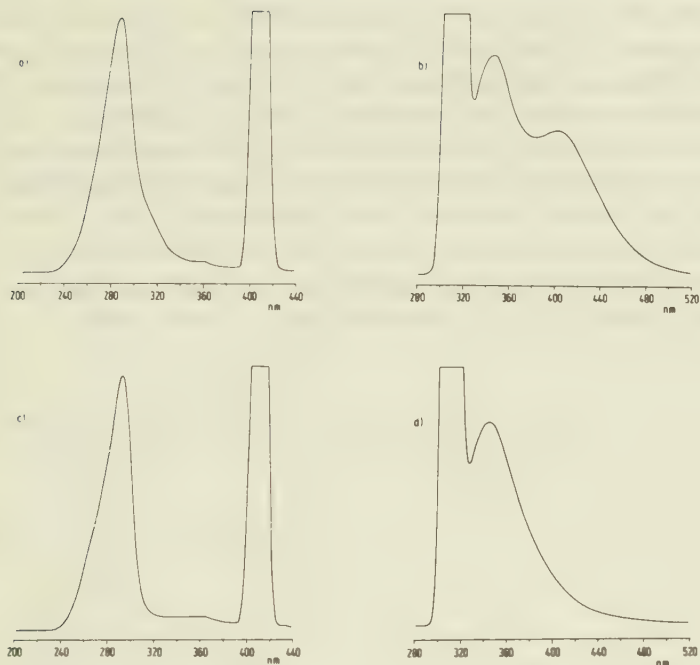


Abb. 61 Anregungs- und Fluoreszenzspektren von Serumalbumin. (1.25 mg/ml). Anregungsspektren (a) und (c) mit der Emissionswellenlänge bei 410 nm. Emissionsspektren (b) und (d) mit der Anregungswellenlänge bei 310 nm.

- (a) Anregungsspektrum einer 0.5 μ M 6-MSS-haltigen Serumalbumin-Lösung.
 - (b) Emissionsspektrum einer 0.5 μ M 6-MSS-haltigen Serumalbumin-Lösung.
 - (c) Anregungsspektrum einer Serumalbumin-Lösung.
 - (d) Emissionsspektrum einer Serumalbumin-Lösung.
- Die Spektren sind nicht korrigiert.

Wird eine Serumalbumin-Lösung bei 310 nm angeregt, ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei 390 nm von der Proteinkonzentration über den beobachteten Bereich (3.6 mg/ml) linear (Abb. 62, Kurve (1)). 6-MSS ändert jedoch das Fluoreszenzverhalten von Serumalbumin und gibt dem Kurvenverlauf hyperbolischen Charakter (Abb. 62). Geht man davon aus, daß im Aktivitätstest 10^{-8} Mol 6-MSS gebildet werden, sind mindestens 1.6 mg Serumalbumin pro ml Testlösung erforderlich, um stets im Bereich maximaler und linearer Fluoreszenzunahme messen zu können. Damit eine sichere Bestimmung auch bei hohen Enzymaktivitäten möglich ist, enthält die Lösung im Standardtest 2.5 mg Serumalbumin pro ml Testlösung.

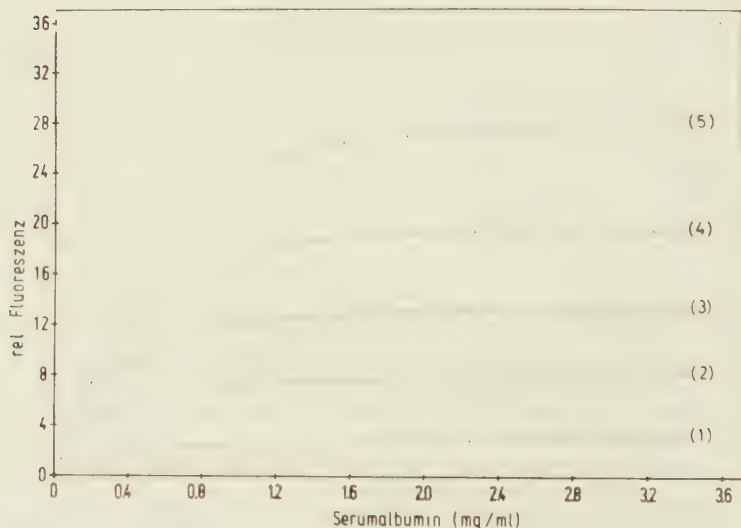


Abb. 62 Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Serumalbumin-Konzentration in Gegenwart verschiedener Mengen 6-MSS.
Bedingungen und Durchführung: siehe Abbildung 60
Die Fluoreszenz von 6-MSS-freiem Serumalbumin wurde bei allen Kurven berücksichtigt.
6-MSS-Konzentration: (1) 1.0, (2) 2.5, (3) 5.0
(4) 7.5 und (5) 10 μ M.

Titriert man eine NADPH-Lösung mit Serumalbumin, beobachtet man bei einer Anregungsenergie von 310 nm eine mit der Proteinkonzentration linear zunehmende Fluoreszenz bei 390 nm (Abb. 63). Die Erhöhung der NADPH-Konzentration ist jedoch von einer nicht-linearen Löschung der Serumalbumin-Fluoreszenz begleitet (Abb. 63, Nebensbild). Die NADPH-bedingte Fluoreszenzlöschung ist auf einen strahlungslosen Energietransfer von angeregten Proteinmolekülen auf NADPH zurückzuführen (84).

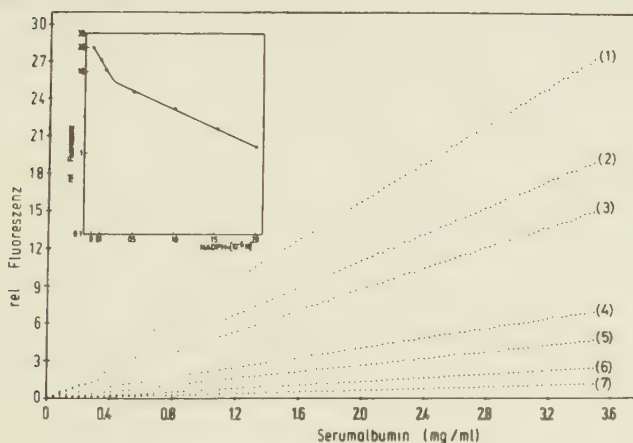


Abb. 63 Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Serumalbuminkonzentration in Gegenwart verschiedener NADPH-Konzentrationen.
Bedingungen und Durchführung: siehe Abbildung 60.
NADPH-Konzentration: (1) 0, (2) 0.1, (3) 0.2, (4) 0.5, (5) 1.0, (6) 1.5 und (7) 2.0×10^{-4} M.
Nebensbild: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der NADPH-Konzentration in Gegenwart von 2.5 mg/ml Serumalbumin.

Verfolgt man bei 390 nm die Fluoreszenz des bei 310 nm angeregten NADPH's, beobachtet man nur bei niedrigen NADPH-Konzentrationen eine lineare Zunahme der Fluoreszenz. Mit steigender Konzentration kommt es aber zu einer Abnahme der Fluoreszenzzunahme und bei hohen Konzentrationen sogar zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 64). Dieser Kurvenverlauf ist auf die hohe Konzentration des Fluorophors zurückzuführen, der vor Erreichen des beobachteten Volumenelements zuviel emittiertes Licht absorbiert. Die Gegenwart von 6-MSS bewirkt eine Löschung der NADPH-Fluoreszenz, ohne jedoch den für NADPH charakteristischen Kurvenverlauf zu verändern. Offensichtlich kommt es auch zwischen NADPH und 6-MSS zu einer Wechselwirkung.

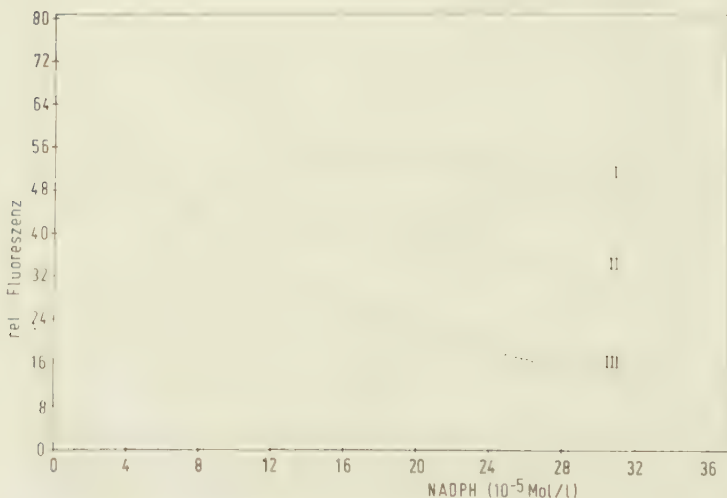


Abb. 64 Abhängigkeit der Fluoreszenz von der NADPH-Konzentration.

Durchführung und Bedingungen: siehe Abbildung 60

Kurve I: ohne Zusätze

Kurve II: 10^{-6} M 6-MSS

Kurve III: 1.25 mg/ml Serumalbumin und 10^{-6} M 6-MSS

Aus diesen Versuchen folgt, daß Serumalbumin im Konzentrationsbereich, der eine maximale 6-MSS-Fluoreszenz bewirkt, das Fluoreszenzsignal 70- bis 80-fach verstärkt, wohingegen NADPH eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung verursacht. Unter Standardbedingungen mit einer 200 μ M NADPH-Testlösung resultiert hieraus eine etwa 10-fache Verstärkung der 6-MSS-Fluoreszenz. Von Vogel (30) wurde eine ca. 30fache Fluoreszenzverstärkung beobachtet.

Aufgrund der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzlöschung nimmt bei einer extrem starken NADPH-Abnahme, was z.B. bei hohen FS-Aktivitäten der Fall ist, die Fluoreszenz zu und täuscht dadurch eine Bildung von 6-MSS vor. Da aber die Aktivität der FS-Synthetase aus *P.patulum* nur 2 bis 3 % des Hefe-Enzyms erreicht, kann dieser ohnehin schwache Effekt im allgemeinen vernachlässigt werden. Ist jedoch

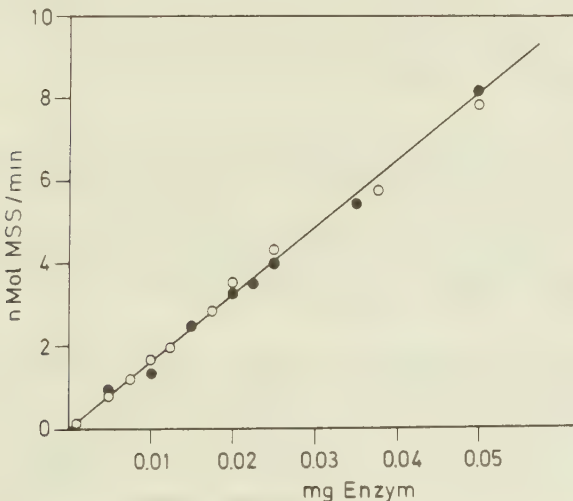
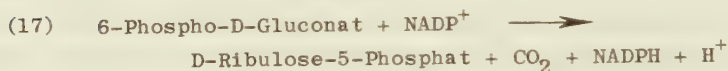
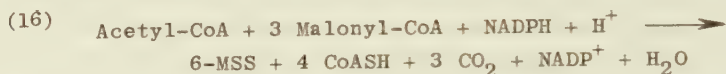


Abb. 65 Abhängigkeit der 6-MSS-Bildung von der Enzymmenge.
(o) Enzymbestimmung ohne NADPH-regenerierendem System.
(•) Enzymbestimmung mit einem NADPH-regenerierendem Enzymsystem (6-Phospho-D-Gluconat-Dehydrogenase).

Experimentelle Einzelheiten: siehe Seite 134

eine absolute Spezifität erforderlich, kann mit einem NADPH-regenerierenden Enzymsystem, z.B. mit 6-Phospho-D-Gluconat-Dehydrogenase, zunächst die gewünschte NADPH-Konzentration eingestellt und diese während der Aktivitätsbestimmung konstant gehalten werden.



Trotz einer enzymatischen Einstellung der NADPH-Konzentration durch UV-Absorptionsmessung muß mit einem Aliquot dieser Lösung und einer 6-MSS-Standardlösung gleichen NADPH-Gehalts das Fluorimeter geeicht werden. Unter diesen Bedingungen findet man keinen Unterschied zum fluorimetrischen Standardtest ohne NADPH-regenerierendes System (Abb. 65).

2. Einfluß der Substrate auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase

Hefe-FS-Synthetase wird reversibel durch Malonyl-CoA gehemmt (60). Analog soll der Einfluß der Substrate auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase untersucht werden.

Wie der Tabelle 15 entnommen werden kann, bleibt die Aktivität der 6-MSS-Synthetase nach einer 15-minütigen Inkubation mit einem der Substrate weitgehend unbeeinflusst oder zeigt wie z.B. in Gegenwart von Acetyl-CoA eine Aktivierung. Verändert ist dagegen die Aktivität der 6-MSS-Synthetase nach einer Inkubation des Enzyms mit beiden Acyl-CoA-Substraten. Unabhängig von der Reihenfolge der Substratzugabe zum Inkubationsansatz wird die Gesamtaktivität bis zu 45 % gehemmt. Eine sich daran anschließende Inkubation mit NADPH

kann der Inaktivierung nur noch begrenzt entgegenwirken. Eine Umkehrung der Inkubationsfolge, beginnend mit NADPH, hat nach Zugabe von Acetyl-CoA o d e r Malonyl-CoA zum Inkubationsansatz keine Hemmung der Synthetase zur Folge; erst die Gegenwart des zweiten Acyl-CoA's verursacht eine 30- bis 40%-ige Teilinaktivierung des Enzyms.

Im weiteren waren wir an der Geschwindigkeit der Inaktivierung interessiert. Während in Abbildung 66 nochmals der Einfluß der einzelnen Substrate auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase dargestellt ist, zeigt Abbildung 67 den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit beider Coenzym-Substrate. Dabei bewirkt eine 15-minütige Vorinkubation des Enzyms mit Acetyl-CoA eine etwas verlangsamte Inaktivierung. Das Ausmaß der Hemmung ist jedoch unabhängig von der Reihenfolge der Substratzugabe.

Tab. 15 Einfluß der Substrate auf die Gesamtaktivität der 6-MSS-Synthetase nach 15-minütiger Inkubation bei 0° C.
Der Inkubationsansatz enthielt 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, 1 mM Dithiothreitol, 2.5 mg/ml 6-MSS-Synthetase und je 1 mM der in der Tabelle angegebenen Substrate. Die Enzymaktivitäten wurden fluorimetrisch bestimmt und sind in der Tabelle in relativen Werten angegeben.

Reihenfolge der Substratzugabe zum Inkubationsansatz:

1.			2.			3.		
AcCoA	MalCoA	NADPH	AcCoA	MalCoA	NADPH	AcCoA	MalCoA	NADPH
133	-	-	-	48	-	-	-	54
-	98	-	45	-	-	-	-	54
-	-	95	97	-	-	-	65	-
-	-	95	-	94	-	67	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-

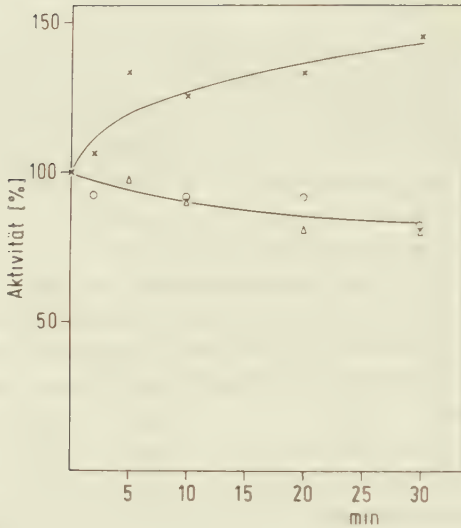


Abb. 66 Abhängigkeit der 6-MSS-Synthetase-Aktivität von einer Inkubation des Enzyms mit 1 mM Acetyl-CoA (x), 1 mM Malonyl-CoA (o) und 1 mM NADPH (Δ).

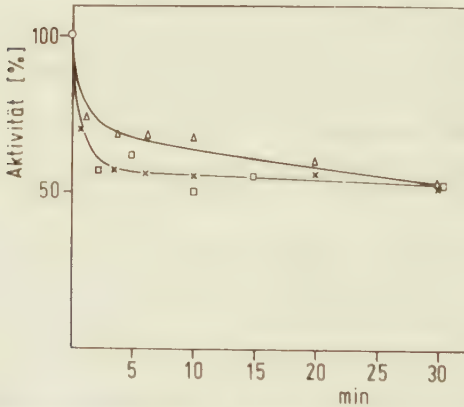


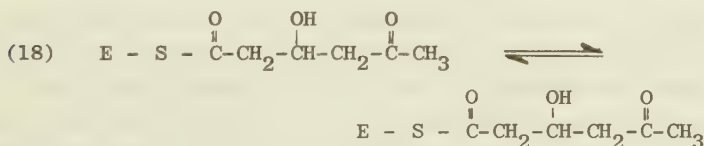
Abb. 67 Abhängigkeit der 6-MSS-Synthetase-Aktivität von einer Inkubation des Enzyms mit je 1 mM folgender Substrate: (Δ) Acetyl-CoA (1. Substrat) und Malonyl-CoA (2. Substrat). (x) Malonyl-CoA (1. Substrat) und Acetyl-CoA (2. Substrat). (□) gleichzeitig Acetyl-CoA und Malonyl-CoA.

Die Zugabe des 2. Substrats erfolgte nach einer 15-minütigen Inkubation des Enzyms mit dem 1. Substrat.

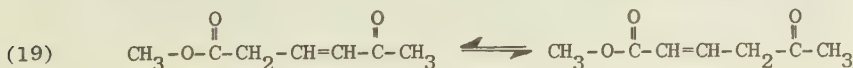
Da NADPH keinen Einfluß auf die Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase zu haben scheint, kann die Lokalisierung der Hemmung im Bereich der Transferasen oder/und Kondensation angenommen werden. Eine Hemmung durch Triacetsäurelaktone dürfte unter den gewählten Bedingungen ausscheiden, zumal auch die mit NADPH gestartete Versuchsreihe eine deutliche Hemmung zeigt. Eine eingehendere Untersuchung der Inaktivierungskinetik scheint sinnvoll zu sein, um einen tieferen Einblick in den Mechanismus der 6-MSS-Synthese zu gewinnen.

3. Zur Bestimmung der Dehydratase-Aktivität

Die für die 6-MSS-Synthese postulierte Wasserabspaltung erfolgt nach dem von Lynen vorgeschlagenen Reaktionsschema (Abb. 1) auf der Stufe der partiell reduzierten Triacetsäure. Dabei entsteht ein cis-3,4-ungesättigtes, enzymgebundenes Reaktionsprodukt.



Schindlbeck (11) versuchte mit 5-Oxo-Hexensäure-methylester nach einem für diese Teilaktivität geeigneten Modellsubstrat. Wegen der großen Instabilität dieser Verbindung war eine Handhabung mit großen Schwierigkeiten verbunden. Gezeigt werden konnte jedoch, daß in polaren Lösungsmitteln zwischen den Isomeren 5-Oxo-Hexen-3-säuremethylester und 5-Oxo-Hexen-2-säuremethylester ein Tautomeriegleichgewicht (Gleichung 19) vorliegt, was auch von Harris (89) bei den freien Säuren beobachtet wurde.



Aufgrund der bei beiden Tautomeren möglichen Resonanzstabilisierung durch α -ständige Carbonylgruppen ist bei Hexensäuren und deren Derivaten eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der 2,3-ungesättigten Säure zu erwarten, so daß eine Dehydratisierung von β -Hydroxy-hexansäure bevorzugt die Hexen-2-säure liefert. Entsprechend sollte man bei β -Hydroxy-hexanoyl-thioestern die Dehydratisierung zum Hexen-2-säure-thioester erwarten, dessen Bildung an Hand der für Dehydroacylthioester charakteristischen Absorption bei 263 nm optisch verfolgt werden könnte.

In der Tat konnten wir mit β -Hydroxy-hexanoyl-pantethein eine Enzym-katalysierte Extinktionszunahme beobachten. Die Dehydratisierung ist linear von der Zeit und der eingesetzten Enzymmenge (Abb. 68) abhängig. Die aus der Substratabhängigkeit (Abb. 69) ermittelten kinetischen Konstanten betragen $K_m = 150 \text{ mM}$ und $V_{\max} = 2.25 \text{ mE (nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1})$.

Außer dieser auch bei der FS-Synthetase vorkommenden Dehydratisierung zum trans-2,3-ungesättigten Acylthioester und einer nachfolgenden Isomerisierung zum cis-3,4-ungesättigten Acylthioester ist auch denkbar, daß die 6-MSS-Synthetase über eine Dehydratase mit einer breiten Substrat- und Wirkungsspezifität verfügt, die sowohl das trans-2,3- als auch das cis-3,4-ungesättigte Produkt liefert. Eine Isomerase wäre dann nicht mehr erforderlich, da die Isomerisierung über die reversible Hydratisierung/Dehydratisierung möglich wäre.

Um zwischen den beiden möglichen Mechanismen unterscheiden zu können, sind weitere Versuche notwendig, wie sie teilweise bei der Dehydratase aus *E. coli*, die β -Hydroxy-decanoyl-thioester sowohl zum trans-Decen-2-säure-thioester als auch zum cis-Decen-3-säure-thioester dehydratisiert, durchgeführt wurden (84,85).

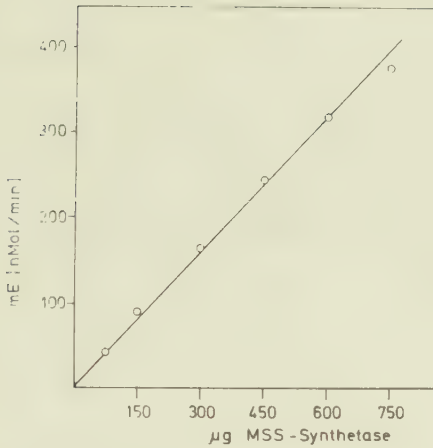


Abb. 68 Abhängigkeit der Dehydratase-Aktivität von der eingesetzten Enzymmenge.
Beschreibung der Enzymbestimmung: siehe Seite 138.

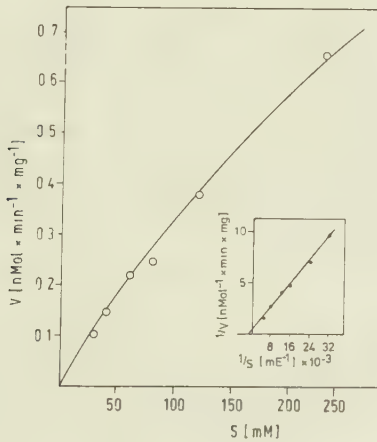


Abb. 69 Abhängigkeit der Dehydratase-Aktivität von der β-Hydroxy-hexanoyl-pantethein-Konzentration.

In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, daß die Dehydratase der 6-MSS-Synthetase mit β -Hydroxy-butanoyl-pantethein keine und mit β -Hydroxy-octanoyl-pantethein nur geringe Aktivität zeigt. Darüber hinaus ist auch der Acyl-Carrier von Bedeutung, da nur der Pantethein-, nicht aber der N-Acetyl-Cysteamin-thioster vom Enzym akzeptiert wird. Entsprechende Versuche mit Coenzym A - Derivaten wurden wegen der hohen Eigenabsorption von Coenzym A nicht durchgeführt.

VIII. EXPERIMENTELLE EINZELHEITEN

1. Verwendete Geräte

Fluoreszenz-Spektralphotometer MPF 3, Perkin-Elmer
Fluoreszenz-Spektralphotometer, Eigenbau Max-Planck-Institut
für Biochemie, Abt. Prof. Zillig, Martinsried.
Photometer Eppendorf mit Kompensationsschreiber GS 11,
Netheler und Hinz, Hamburg.
Spektralphotometer PM 6 und DMR 21, Zeiß, Oberkochen.
Spektralphotometer Cary, Modell 14.
Durchflußphotometer Isco, Modell UA-5
Durchflußphotometer Uvicord II, LKB, Uppsala, Schweden.
Searle, Nuclear Chicago Division, Mark II, Liquid
Scintillation System.
Präparative Zentrifuge Wkf, Modell G50K
Automatic Superspeed Centrifuge, Sorvall, Modell RC2 und RC28
Präparative Ultrazentrifuge, Beckmann-Spinco, Modell L3-50,
L2-65B.
Analytische Ultrazentrifuge, Beckmann-Spinco, Modell E.
Tischzentrifuge Christ, Superspeed Junior 1.
Tischzentrifuge Eppendorf, Modell 3200.
Fraktionskollektoren und Schlauchpumpen der Firma LKB.
pH-Meter E 500, Metrohm, Herisau.
Zellhomogenisator nach Merckenschlager, Schloßmann und
Kurz (98),
Eigenbau, Moosbauer, Biochemisches Institut der Universität
München
Kugelmühle. 3 l, Rosenthal.
Hochdruckdampfsterilisator, Euroclinic, Modell Pulsmatic.
Gyrotory Shaker, New Brunswick, Modell G 53.
Fermentor, New Brunswick, Modell FS-314.
Fermentor, Bioengineering, Uster/Schweiz.
Wäscheschleuder, Fa. Miele.
Lyophilisator, Wkf, Modell L05 und L2.
Omni-Mixer, Servall, Typ 17220.
Elektrophorese-Apparatur, Eigenbau, Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried, Abt. Prof. Zillig.

2. Reagenzien

Amersham-Buchler, Braunschweig: 1-¹⁴C-Jodacetamid, 1-¹⁴C-Essigsäureanhydrid und Na-¹⁴C-Hydrogencarbonat.

Behringwerke, Marburg: Rinderserumalbumin, Freundesches Adjuvans (komplett).

Biomol, Ilvesheim: Dithiothreitol, hochrein 99%

BioRad, Laboratories GmbH: Hydroxylapatit (Biogel HT)

Boehringer, Mannheim: Sämtliche Enzyme, Coenzyme und Substrate, sofern nicht anders angegeben.

Brenntag GmbH, Mühlheim: Niox Polyol

Difco Laboratories, Detroit (USA): Bacto-Agar, Bacto-Yeast-Extract

Dragon-Werk, Georg Wild, Bayreuth: Glasperlen (Reflexperlen)
31/10

Merck, Darmstadt: Sämtliche Chemikalien, wenn nicht anders angegeben.

Pharmacia, Uppsala/Schweden: Dextran Blau 2000, Sephadex G 10, G 25 (medium), G 50 (medium), Sepharose 6 B, DEAE - A 25.

Roth, Karlsruhe: β -Mercaptoäthanol, Patulin

Serva, Heidelberg: Acrylamid, N,N'-Metylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED). Dowex 50 x 4 und 1 x 4, Natriumdodecylsulfat (SDS), Coomassie Brilliant blau G 250, Polyäthylenglykol 6000 und 1500.

Sigma: Guanidin-HCl, p.A., Pantethin. Guanidin-HCl, p.A.

Fettsäuresynthetase aus Bierhefe wurde von Herrn F. Wieland, RNA-Polymerase aus E. coli von Herrn H. Heumann, Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe von Herrn Dr. Dr. Spieß zur Verfügung gestellt.

3. Synthese von Substraten

Acetyl-CoA und 1-¹⁴C-Acetyl-CoA nach (86)

Malonyl-CoA und 2-¹⁴C-Malonyl-CoA nach (87)

Pantethein durch Reduzieren von Pantethin mit NaBH₄ (89)

N-Capryloylcysteamin und S-Malonyl-N-Capryloylcysteamin nach (87)

Acetyl-Pantethein analog nach (86).

Jodacetamid-(aus Wasser und Chloroform umkristallisiert) und N-Äthylmaleinimid-Lösungen wurden stets frisch angesetzt.

Freundlicherweise wurden zur Verfügung gestellt:

S-2-¹⁴C-Malonyl-N-Capryloyl-Cysteamin von Herrn Dr. Schindlbeck.

6-Methylsalicylsäure (nach Eliel (91) hergestellt)

Triacetsäurelaktone (Herstellung nach Collie (92) und

Triacetsäureäthylester von Herrn Dr. Seyffert.

Dimethyl-3,3'-(Tetramethyldioxyd)dipropionimidat von Herrn Dr. Schramm.

S-Acetyl-N-Acetyl-Cysteamin von Herrn Dr. Kresze.

4. Analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wird nach der Biuretmethode (96) bestimmt.

Bei verdünnten Proteinlösungen wird, wenn nicht eigens angegeben, die optische Bestimmungsmethode durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm (97) verwendet. Bei einigen Proteinlösungen wird das Protein mit Amidoschwarz angefärbt und photometrisch (82) bestimmt.

b) Radioaktivitätsmessung

Die ¹⁴C-Bestimmungen werden im Szintillationsspektrometer durchgeführt. Petrolätherlösliche und toluollösliche Verbindungen werden mit Toluolszintillationslösungen, wäßrige Lösungen mit Unisolve versetzt und gezählt.

Toluolszintillationslösung:

1000 ml destilliertes und über basisches Aluminiumoxyd filtrier-

tes Toluol werden mit 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0.5 g 1,4-Bis-2(4-methyl-5-phenyloxazo)benzol (Dimethyl-POPOP) versetzt und in einer lichtgeschützten Flasche aufbewahrt.

c) Gehaltsbestimmung von Substraten und Präparaten
Thioester werden mit der verzögerten Nitroprussidreaktion nach Lynen (90) oder durch Messung der Thioesterabsorption bei 233 nm $\epsilon = 4.600 \text{ cm}^2/\text{mMol}$ (93) gegen eine Vergleichsküvette mit der gleichen Menge verseiften Thioesters bestimmt.

Thiole werden mit Ellman's Reagens (= DTNB) bestimmt (59) ($\epsilon = 13600 \text{ cm}^2/\text{mMol}$).

Acetyl-CoA wird nach (94) bestimmt, Malonyl-CoA mit dem optischen Test für Fettsäuren.

Coenzym A wird nach (95) bestimmt.

5. Zu Kapitel II

a) Kultivieren von *P. patulum*

α) Schrägagarkultur

Als Stamm wird *P. patulum* NRRL 679 verwendet. Die Aufbewahrung und Fortführung des Stammes erfolgt auf festen Nährböden mit 1,5% Agar und 5% Haferflocken (10ml pro 180 x 18 mm Reagenzglas). Alle 4 - 8 Wochen werden die Sporen auf frisches Medium überimpft. Dazu schüttelt man die Sporen eine Minute mit einer 0,1%igen Triton X 100 Lösung und verteilt die Suspension mit einer sterilen Pipette auf die neuen Nährböden.

β) Submerse Züchtung von *P. patulum*

Für submerse Züchtung wird das von Dimroth (6,7) benützte Czapek-Dox-Medium verwendet. Es setzt sich zusammen aus 30 g Glucose, 2.5 g Hefeextrakt, 2.5 g K_2HPO_4 , 2.5 g KH_2PO_4 , 3 g NaNO_3 , 0.5 g MgSO_4 und 0.1 g KCl je Liter Medium.

Für die Vorkultur wird die Lösung in 600 ml Portionen auf Fernbachkolben verteilt und 15 Minuten bei 120°C im Autoklaven erhitzt. Für die Zwischen- und Hauptkultur werden Salz- und Glucose-Hefeextraktlösungen getrennt 120 bzw. 15 Minuten bei 120°C sterilisiert.

Vorkultur

Mit der Suspension 3-8 Wochen alter Sporen aus einem Schrägagar-röhrchen werden 3 Fernbachkolben angeimpft. Das Wachstum erfolgt bei 30° C unter ständigem Schütteln (110-120 Upm). Nach 32 bis 36 Stunden kann die Vorkultur zum Beimpfen der Zwischenkultur eingesetzt werden.

Zwischenkultur

Der Inhalt von 3 Fernbachkolben dient zum Animpfen von 10 l Medium in einem 14-Liter-Fermentor. Die Züchtung wird bei 25° C unter ständigem Rühren (200 Upm) und Belüften (360 l/h) 24 Stunden fortgesetzt. 5 Tropfen Niax-Polyol reichen aus, um die Schaumbildung zu verhindern. Die Abluft wird durch 5 l einer 50%igen alkoholischen Lösung mit 1 M KOH geleitet.

Hauptkultur

Sie wird in einem 240-Liter-Fermentor durchgeführt, der 200 l steriles Medium enthält. Diese wird mit dem Inhalt von 4 Fermentoren der Zwischenkultur angeimpft. Die Kultur wird während des Wachstums bei 25° C mit 150 Upm gerührt und mit 8000 l/h belüftet. Als Antischaummittel werden 10 ml Niax-Polyol zugegeben. Hat der pH-Wert des Kulturmediums nach 11 - 16 Stunden einen Wert von 4.7 bis 5.0 erreicht, wird das Mycel geerntet.

Ernten des Mycels

Das Mycel wird durch Abschleudern in kleinen Säcken aus Siebleinen vom Kulturmedium getrennt, mit ca. 50 - 100 l entjonisiertem Wasser gewaschen und in einer Wäscheschleuder möglichst trocken geschleudert. Zur Aufbewahrung werden die Zellen lyophilisiert und bei - 30° C in Plastikflaschen gut verschlossen aufbewahrt.

Die Züchtung in diesem Maßstab ergibt 400 - 500 g Lyophilisat.

γ) 6-MSS-Synthetase-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstum

Einem Fermentor wird zu verschiedenen Zeiten 1 Liter mycelhaltiges Nährmedium entnommen.

Bestimmung des Trockengewichts

Das Mycel von 100 ml Nährmedium wird abgesaugt, gewaschen, 24 Stunden bei 120° C getrocknet und gewogen. Die Glasgefäße für die Bestimmung des Trockengewichts werden zuvor mindestens zweimal 24 Stunden auf 120° C erhitzt und deren Gewicht bestimmt.

Herstellen eines zellfreien Extraktes zur Bestimmung der 6-MSS-Synthetase-Aktivität

Gewaschenes Mycel (2 bis 5 g) werden in 25 ml 0.1 Tris-HCl-Puffer, pH 7.8 (4° C), mit 20 % Glycerin, 5 mM β -Mercaptoäthanol und 5 mM EDTA suspendiert und 60 Sekunden mit 25 g Glasperlen in einem kleinen Zellhomogenisator unter intensiver Kühlung exzentrisch geschüttelt. Das Homogenat wird danach 15 Minuten bei 30 000 g zentrifugiert. Im Überstand wird der Proteingehalt nach der Biuretmethode und die Enzymaktivität der 6-MSS-Synthetase nach Abschn. VIII.10.a) bestimmt.

b) Reinigung der 6-MSS-Synthetase

Für die Anreicherung werden etwa 150 g lyophilisiertes Mycel verarbeitet. Alle Anreicherungs-schritte werden bei 0 bis 5° C und möglichst ohne längere Unterbrechungen durchgeführt. Bei einiger Übung lassen sich innerhalb von 2 bis 3 Tagen 120 bis 150 mg einheitliche 6-MSS-Synthetase isolieren.

Schritt 1: Herstellen eines zellfreien Extraktes.

Die Zellen werden entweder in einem Zellhomogenisator mit Glasperlen (98) oder in einer Kugelmühle aufgeschlossen.

1. Zellaufschluß mit einem Zellhomogenisator:

12 g des lyophilisierten oder 60 g des frisch geernteten und gewaschenen Mycels werden mit 250 g Glasperlen, 250 mg PMSF und 250 ml Aufschlußpuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 5×10^{-3} M EDTA, 5×10^{-3} β -Mercaptoäthanol, 20 % (v/v) Glycerin und 3 % (w/v) PEG 6 000) für 90 Sekunden in dem von Merckenschlager (98) entwickelten Homogenisator bei 4 200 Upm unter intensiver Kühlung exzentrisch geschüttelt. Der Extrakt, von Glasperlen und nicht-aufgeschlossenem Mycel über eine Glasfilternutsche abgetrennt, wird 30 Minuten mit 20 000 g zentrifugiert.

2. Zellaufschluß mit einer Kugelmühle:

150 g der lyophilisierten Zellen werden in einer Kugelmühle bei 4° C langsam staubfein gemahlen, in ca. 3.5 l Aufschlußpuffer suspendiert und mit einem Omni-Mix-Homogenisator 10 Minuten unter Kühlung homogenisiert. Die Suspension wird 30 Minuten mit 20 000 g zentrifugiert.

Der Ansatz ergibt etwa 3 l eines gelblich, leicht trüben Rohextraktes mit 12 bis 14 mg Protein/ml.

Schritt 2: Erste Fällung mit Polyäthylenglykol 6 000.

Zum Überstand von Schritt 1 werden innerhalb von 5 Minuten 180 ml einer wäßrigen 50 %igen (w/w) Polyäthylenglykol-Lösung je 1000 ml Rohextrakt gegeben und weitere 5 Minuten gerührt. Die Fällung wird 20 Minuten mit 14 000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält weniger als 3 % der Aktivität im Rohextrakt. Der Niederschlag wird in ca. 300 ml Puffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5×10^{-3} M EDTA, 5×10^{-3} M β -Mercaptoäthanol, 20 % Glycerin und 4 % (w/v) PEG 6 000, pH 7.8)

gelöst und erneut 30 Minuten mit 30 000 g zentrifugiert.

Schritt 3: Zweite Fällung mit Polyäthylenglykol 6000.

Der Überstand aus Schritt 2 wird sofort mit einer wäßrigen 50 %igen (w/w) Polyäthylenglykol-Lösung bis zu einer Sättigung von 9 % (w/v) versetzt. Das Zutropfen des Fällungsreagens erfolgt innerhalb von 5 Minuten. Nach einer Rührzeit von weiteren 5 Minuten wird die Fällung 30 Minuten mit 15 000 g zentrifugiert. Der zähe, tiefgrüne Niederschlag, der die gesamte Aktivität enthält, läßt sich mit etwa 100 ml Puffer (0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, 1×10^{-2} M Dithiothreitol, 5×10^{-3} M EDTA, 15 % Glycerin und 22 % d.S. Ammoniumsulfat) aufnehmen und wird eine Stunde mit 140 000 g klar zentrifugiert.

Schritt 4: Fällung mit Ammoniumsulfat.

Die Enzymlösung wird mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, pH 7.8, bis zu 37 % d. S. versetzt, 10 Minuten gerührt und 30 Minuten mit 40 000 g zentrifugiert. In ca. 25 ml 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, der 10 % Glycerin und 1×10^{-2} M Dithiothreitol, aber kein EDTA enthält, wird der feste Niederschlag aufgenommen.

Schritt 5: Adsorption an Hydroxylapatit.

Zur Vorbereitung der Enzymlösung wird diese über eine Säule (6 x 30 cm), gefüllt mit Sephadex G 50 medium und äquilibriert mit 30 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, mit 10 % Glycerin und 1 mM Dithiothreitol, entsalzt. Danach kann sie mit einer Hydroxylapatit-Säule (8 x 15 cm), die mit Startpuffer (30 mM K-Phosphat, 10 % Glycerin und 1 mM Dithiothreitol) äquilibriert ist, fraktioniert werden. Auf die Hydroxylapatit-Säule können maximal 2 g Protein aufgetragen werden, das stufenweise mit steigender Phosphatkonzentration im Elutionspuffer eluiert werden kann. Sämtliche Puffer enthalten 10 % Glycerin und 1 mM Dithiothreitol, aber kein EDTA, und müssen vor Gebrauch gut entgast werden. Die

Durchflußgeschwindigkeit von 200 ml/h wird mit einer Schlauchpumpe konstant gehalten. Mit Startpuffer wird zunächst nicht-absorbiertes Protein, das - sofern die Hydroxylapatit-Säule nicht überladen wird - keine 6-MSS-Synthetase-Aktivität enthält, von der Säule gewaschen. Das aktive Enzym kann anschließend mit 80 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, eluiert werden. Die stark verdünnte Enzymlösung muß sofort mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung, pH 7.8, auf halbmaximale Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht werden. Die Fällung wird 10 bis 15 Minuten gerührt und danach 120 Minuten mit 14 000 g zentrifugiert. Mit ca. 12 ml 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, der 1 mM EDTA und 10 mM Dithiothreitol, aber kein Glycerin enthält, wird der weiße Niederschlag aufgenommen.

Schritt 6: Stufengradientenzentrifugation.

In Zentrifugenbechern für den Festwinkelrotor vom Typ 30 (Beckmann) wird ein Dreistufengradient von Rohrzucker aufgebaut. Die untere Stufe enthält 3 ml 45 % (w/v) Rohrzucker, die mittlere 6 ml 25 % (w/v) Rohrzucker und die obere 16 ml 15 % (w/v) Rohrzucker in 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, 1 mM EDTA, 10 mM Dithiothreitol und 10 % (v/v) Glycerin gelöst. Auf einen Gradienten können 20 bis 40 mg Protein aufgetragen werden. Die Zentrifugation dauert bei 25 000 Upm und 2° C 12 Stunden. Nach beendetem Lauf wird in den Becher von oben eine ca. 10 cm lange Injektionsnadel eingeführt und der Inhalt von unten fraktioniert. Die relative Proteinkonzentration kann mit einem Durchflußphotometer bei 280 nm verfolgt werden. Unter diesen Bedingungen enthalten die unteren 8 ml Zuckerlösung die aktive 6-MSS-Synthetase.

Schritt 7: Hydrophobe Affinitätschromatographie.

Die Kupplung des Diaminobutans an BrCN-aktivierte Sepharose 4 B erfolgt nach der Vorschrift (107).

2 g BrCN-aktivierte Sepharose 4 B, Laktose-Dextran stabilisiert, werden mit 500 ml 1 mM HCl-Lösung gewaschen.

10 ml 2 M Diaminlösung, mit 6 N HCl auf pH 10 eingestellt, werden in die Gelsuspension eingerührt. Das Gel wird mit 1 M Tris-HCl, pH 8 gewaschen und zum Abreagieren der noch vorhandenen aktiven Gruppen zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach wird das Gel nacheinander mit jeweils 500 ml folgender Lösungen gewaschen: Wasser, 1 N NaCl, Wasser und 50 mM K-Phosphat, pH 7.8, mit 10 % Glycerin, 10 mM Dithiothreitol und 5 mM EDTA.

Auf 1 ml 4-Amino-butyryl-Sepharose 4 B können bis zu 10 mg Protein aufgetragen werden. Die Elution erfolgt mit einem 0.2 bis 0.5 M NaCl-Gradienten. Das eluierte Protein wird mit Ammoniumsulfat gefällt und der Niederschlag mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, der 50 % Glycerin, 5 % d. S. Ammoniumsulfat, 10 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA enthält, langsam gelöst, bis eine Proteinkonzentration von 15 bis 20 mg/ml erreicht wird.

6. Zu Kapitel III

a) Analytische Ultrazentrifugation

Alle Experimente werden in einer analytischen Ultrazentrifuge vom Typ Spinco Modell E mit Scanner-Optik und dem Rotortyp An H durchgeführt. Die Temperatur beträgt bei allen Läufen 20.0° C. Alle Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe werden mit Aluminiumzellen mit Kunststoffmittelstück bei einer Schichtdicke von 12 mm ausgeführt. Die Proteinkonzentration liegt zwischen 0.0280 nm 0.6 und 0.75. Die Umdrehungsgeschwindigkeit beträgt 60 000 Upm.

Die Gleichgewichtszentrifugation wird mit Hilfe eines Sechskanalmittelstückes nach Yphantis (88) durchgeführt. Die Proteinkonzentration beträgt 0.4 mg/ml, die Umdrehungsgeschwindigkeit 2 800 Upm. Das Gleichgewicht wurde nach 48 Stunden erreicht. Nach dem Lauf wird die Umdrehungsgeschwindigkeit

auf 48 000 Upm erhöht, nach dem Abzentrifugieren des Proteins wieder auf den ursprünglichen Wert verringert und dann die Grundlinie bestimmt.

b) Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie wird an Sepharose 6 B durchgeführt. Abmessungen der verwendeten Chromatographiesäule: 1.6 x 150 cm. Das Gel wird mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, äquilibriert. Alle Versuche werden bei 4 bis 6° C durchgeführt. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 6 ml/h. Die einzeln aufgetragenen Proteinlösungen (0.2 bis 0.5 ml) werden im Eluat mit einem Durchflußphotometer bestimmt.

c) Zentrifugation im Rohrzuckergradienten

Gradientenzentrifugationen werden sowohl mit den Rotoren SW 27 und SW 41 durchgeführt.

In Cellulosenitratbechern werden lineare Gradienten von 5 bis 25 % (w/v) Saccharose aufgeschichtet. Die Zuckerlösungen enthalten 10 % Glycerin und sind 0.1 M an K-Phosphat, 10 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA.

Die Gradienten werden mindestens vier Stunden im Kühlraum temperiert. Die Zentrifugationszeiten betragen, wenn nicht anders angegeben, 10 Stunden bei 36 000 Upm mit dem Rotor SW 41 bzw. 20 Stunden bei 25 000 Upm mit dem Rotor SW 27.

d) Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese wird in einer von Rhigetti (99) vorgeschlagenen Elektrophorese-Apparatur mit dem von Maurer (100) beschriebenen Gelsystem Nr 1 durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels beträgt 5 %, die des Sammelgels 3.75 %.

Pro Gel werden 10 bis 50 µg Protein, versetzt mit Sammelgelpuffer und einigen Tropfen Glycerin und leicht angefärbt

mit Bromphenolblau, aufgesetzt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

Lösung für das Trenngel:

5 % Acrylamid, 0.133 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.01 % (w/v) Tetramethyläthylendiamin, 0.7 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ und 40 mM Tris-HCl, pH 8.9.

Lösung für das Sammelgel:

2.5 % Acrylamid, 0.6 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.01 % (w/v) Tetramethyläthylendiamin, 0.7 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 5 mM Tris/HCl, pH 6.9.

Nach Anlegen der Spannung wird die Stromstärke für 10 Minuten auf 2 mA/Gelröhrchen, danach auf 4 mA/Gelröhrchen eingestellt und konstant gehalten.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgt mit einer Coomassie G 250 - Lösung. In einer Lösung aus 75 ml Eisessig, 100 ml Methanol und 825 ml Wasser werden die Gele entfärbt.

e) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird in vertikal stehenden Plattengelen durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration durchläuft im Trenngel einen linearen Gradienten von 5 bis 15 % und beträgt im Obergel 3.7 %. Die sonstige Zusammensetzung der Gellösungen entspricht den Angaben von Laemmli (51).

Lösungen für das Gradientengel:

Lösung 1: 5 % Acrylamid, 0.13 % Methylenbisacrylamid, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.33 % SDS, 0.01 % (w/v) Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und 0.25 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Lösung 2: 15 % Acrylamid, 0.4 % Methylenbisacrylamid, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.08 % SDS, 0.01 (w/v) Tetramethyläthylendiamin und 0.25 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Lösung für das Obergel: 3 % Acrylamid, 0.08 % Methylenbisacrylamid, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.025 % (w/v) Tetramethyläthylendiamin und 0.6 mg/ml $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Die Elektrophorese erfolgt bei 4⁰ C und 150 V. Danach wird das Gel eine Stunde bei 50⁰ C in einem Färbegrad aus 1.25 g Coomassie G 250, 454 ml 50 % (v/v) Methanol und 46 ml Eisessig angefärbt und bei 50⁰ C in einem Entfärbegrad mit 7.5 % Eisessig und 10 % Methanol entfärbt.

f) Citraconylierung und Carboxymethylierung der 6-MSS-Synthetase (51)

6-MSS-Synthetase (ca. 3 mg), gelöst in 200 µl 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, wird mit dem doppelten Volumen einer Lösung mit 7.5 M Guanidin-HCl, 0.7 M Triäthanolamin-HCl, pH 8.3, verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zu 600 µl des Inkubationsansatzes werden in 10 Portionen 60 µl einer frisch zubereiteten Citraconsäureanhydrid-THF-Mischung (1:1) innerhalb von 10 Minuten zugegeben. Temperatur (4⁰ C) und pH-Wert (pH 8.0 bis 8.5) werden konstant gehalten.

Vor der Carboxymethylierung werden die Thiolgruppen der citraconylierten 6-MSS-Synthetase (ca. 1 ml) mit 10 µl β-Mercaptoäthanol 60 Minuten bei Raumtemperatur reduziert. Danach werden 75 µl einer Jodessigsäurelösung (0.268 g Jodessigsäure in 1 ml 1 N NaOH) zugegeben. Während der 15-minütigen Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird der pH-Wert über pH 8 gehalten.

Nach Dialyse der citraconylierten und carboxymethylierten 6-MSS-Synthetase gegen Elektrophorese-Puffer, der 6 M Harnstoff enthält, wird eine Elektrophorese in 5 %igen Polyacrylamidgelen, die ebenfalls 6 M Harnstoff enthalten, durchgeführt.

g) Verbrücken der 6-MSS-Synthetase mit bifunktionellen Imidoestern (101)

6-MSS-Synthetase (ca. 2 mg) in 0.2 M Triäthanolamin-HCl, pH 8.2, wird mit verschiedenen Mengen Verbrückungsreagenz Dimethyl-3,3'-(tetramethyldioxy)dipropionimidat drei

Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation im Rohruckergradienten (8 bis 25 % (w/v)) wird intermolekular verbrückte 6-MSS-Synthetase abgetrennt.

Intramolekular vernetzte Synthetase wird nach Spaltung mit SDS, Harnstoff und β -Mercaptoäthanol (65° C. 45 Minuten) einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen.

7. Zu Kapitel IV.

a) Inhibierung der 6-MSS-Synthetase mit Hemmstoffen

Durch Filtration an Sephadex G 50 medium werden niedermolekulare Mercaptane aus der 6-MSS-Synthetaselösung entfernt.

Diese "thiolfreie" Enzymlösung wird mit den jeweils angegebenen Konzentrationen Hemmstoff inkubiert. Zur Verfolgung der Hemmung werden nach verschiedenen Zeiten Aliquote dem Ansatz entnommen und die Restaktivität bestimmt. Stopplösung (10 mM Dithiothreitol oder Mercaptoäthanol) ist nur bei der Bestimmung der Acetyl- und Malonyl-Transferase notwendig.

b) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Durch Gelfiltration an Sephadex G 50 medium werden niedermolekulare Mercaptane abgetrennt und das Enzym mit 50 mM K-Phosphat, pH 7.8, äquilibriert. Aliquote dieser Enzymlösung werden zur Konzentration 0.2 M des entsprechenden Puffers mit pH-Werten zwischen 6.5 und 10.0 versetzt. Um pH-abhängige Aktivitätsverluste erfassen zu können, wird vor Zugabe des Hemmstoffes der Ansatz geteilt, der eine Teil mit Jodacetamid (Endkonzentration: 5×10^{-4} M), der andere mit der gleichen Menge H_2O versetzt. Die Restaktivität wird nach 5, 10 und 15 Minuten bestimmt.

8. Zu Kapitel V.

a) Dissoziation der 6-MSS-Synthetase

Durch Gelfiltration an Sephadex G 50 - äquibriert mit 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA - wird restliches Ammoniumsulfat und das zur Stabilisierung des Enzyms notwendige Glycerin abgetrennt. Die Proteinlösung (4 bis 10 mg/ml) wird mit LiCl bis zu einer Konzentration von 2 M versetzt und bei 0°C 4 Stunden inkubiert.

Zur Untersuchung des Spaltansatzes in der analytischen Ultrazentrifuge wird die mit LiCl versetzte Enzymlösung über Sephadex G 50 - äquibriert mit obigem Puffer - entsalzt und bis zum Füllen der Meßzellen bei 0°C gehalten.

b) Rekonstitution gespaltener 6-MSS-Synthetase

Das mit LiCl inaktivierte und gespaltene Enzym wird über eine mit 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA äquibrierte Sephadex G 50 - Säule entsalzt. Die Reaktivierung wird durch Zugabe von K-Phosphat , pH 7.8, bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M und durch Inkubation des Reaktivierungsansatzes bei 20°C gestartet.

9. Zu Kapitel VI.

a) Gewinnung der Antiseren

1 mg 6-MSS-Synthetase wird einem Kaninchen in 8 Portionen zu je 100 µg mit kompletten Freund'schen Adjuvans wöchentlich subcutan und danach einmal 200 µg Antigen ohne Adjuvans intraperitoneal injiziert. Vor der ersten und 10 Tage nach der letzten Injektion werden jeweils 40 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und daraus durch Zentrifugation das Kontroll- bzw. das Anti-6-MSS-Synthetase-Serum gewonnen.

b) Anreicherung der γ -Globuline

20 ml Serum werden mit festem Ammoniumsulfat bis zu 40 % d.S. gebracht, 30 Minuten gerührt und 30 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit etwa 10 ml einer 1.75 M Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen und zentrifugiert. Für die weitere Anreicherung wird 20 mM K-Phosphat, pH 7.5, verwendet. Mit diesem Puffer wird der Niederschlag aufgenommen und über Nacht bei 4° C dialysiert. Die während der Dialyse ausgefallenen Proteine werden vor der folgenden Chromatographie an DEAE-Cellulose abzentrifugiert. Nach dem Auftragen des Überstandes auf eine DEAE-Cellulose-Säule (100 ml) kann mit Startpuffer IgG und IgA eluiert werden. Durch Aussalzen des Proteins mit Ammoniumsulfat läßt sich das Protein im Eluat konzentrieren.

c) Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (102)

In 100 ml heißem 0.1 M K-Phosphat, pH 7.8, werden 0.6 g Agarose gelöst und 1 ml einer 2 %igen NaN_3 -Lösung zugegeben. Je 13 ml der noch heißen Lösung werden in Petrischalen gegossen. Nach dem Gelieren des Agars wird mit einem Korkbohrer die Anordnung der 4 mm Löcher markiert und das Gel mit einem schwachen Vakuum aus den Löchern gesaugt.

Für den Diffusionstest werden die zentralen Vertiefungen mit 5 μl Antigen (1 mg/ml), die peripher gelegenen mit je 5 μl Antikörper-Lösung verschiedener Konzentration gefüllt.

Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit kann präzipitiertes Protein mit einer Amidoschwarzlösung angefärbt und mit 7 %iger Essigsäure entfärbt werden. Nicht präzipitiertes Protein muß zuvor durch reichliches Waschen mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.8, entfernt werden.

d) Immuno-Elektrophorese

Die Immuno-Elektrophorese wird nach Scheidegger (103) in einer Shandon-Universal-Elektrophoresekammer durchgeführt. Das Gel mit 1% Agarose und 0.02 % NaN_3 in 0.1 M K-Phosphat, pH 7.5, wird auf einem Objektträger polymerisiert. Zur Aufnahme von 5 μl Proteinelösung (1 mg/ml) wird eine Vertiefung ausgestanzt. Das Antigen wird erst einer Elektrophorese (1. Dimension) und dann der Immundiffusion (2. Dimension) unterworfen.

Die Elektrophorese wird bei 4 mA pro Objektträger über 90 Minuten bei 4° C durchgeführt (Elektrodenpuffer: 0.05 M K-Phosphat, pH 7.5). Bei der anschließenden Immundiffusion läßt man bei Raumtemperatur die Antikörper senkrecht gegen die in der Elektrophorese aufgetrennten Antigene diffundieren.

e) Gesamtaktivität und Teilaktivitäten der 6-MSS-Synthetase in Gegenwart von Anti-6-MSS-Synthetase

Die Bestimmung der Gesamt- und Teilaktivitäten erfolgt wie unter VIII. 10. beschrieben. Jedoch werden alle Tests mit Enzym gestartet, das mit der entsprechenden Menge Anti-6-MSS-Synthetase 5 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert wird.

10. Zu Kapitel VII.

a) Gesamtaktivität der 6-MSS-Synthetase

Eine Millieinheit (1 mE) ist die Enzymmenge, die unter Testbedingungen 1 nMol 6-MSS-Synthetase pro Minute bildet bzw. 1 nMol NADPH pro Minute umsetzt.

α) Optischer Standard-Enzymtest

Im Küvettenvolumen 1 ml sind enthalten: 100 μMol NADPH, 0.05 μMol Acetyl-CoA und die Enzymlösung (0.1 bis 1 mE).

Nach ausreichender Temperierung (25°C) wird über 1 bis 2 Minuten der Blindwert verfolgt und danach durch Zugabe von $0.2\text{ }\mu\text{Mol}$ Malonyl-CoA die Reaktion gestartet. Die Änderung der Extinktion kann bei 334 nm gemessen werden.

β) Fluorimetrischer Standardenzymtest ohne NADPH-regenerierendes System (30)

In einem Gesamtvolumen von 2 ml werden $200\text{ }\mu\text{Mol}$ K-Phosphat, pH 7.6 , 5 mg Rinderserumalbumin, 400 nMol NADPH, 200 nMol Acetyl-CoA und 10 bis $200\text{ }\mu\text{g}$ 6-MSS-Synthetase bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 400 nMol Malonyl-CoA wird die 6-MSS-Synthese gestartet. Diese Enzymbestimmung kann nur mit einem Fluorimeter durchgeführt werden, das einen Anregungs- und einen Emissionsmonochromator sowie die Möglichkeit der Nullpunktsunterdrückung besitzt.

Die Anregung erfolgt zwischen 306 und 314 nm , die Emission kann zwischen 386 und 394 nm gemessen werden. Vor und nach jeder Meßreihe muß das Fluorimeter mit einer 6-MSS-Standardlösung (1 bis 5 nMol) geeicht werden.

γ) Fluorimetrischer Standardenzymtest mit einem NADPH-regenerierenden System

In einem Volumen von 5 ml werden $500\text{ }\mu\text{Mol}$ K-Phosphat, pH 7.6 , 12.5 mg Serumalbumin, 500 nMol Acetyl-CoA, $1\text{ }\mu\text{Mol}$ NADP^{+} , $7\text{ }\mu\text{Mol}$ Gluconat-6-Phosphat und $50\text{ }\mu\text{Mol}$ MgCl_2 bei 25°C inkubiert.

Die Einstellung einer Konzentration von 200 mM NADPH erfolgt mit Hilfe eines Filter-Photometers bei 334 nm . Nach Zugabe von 0.1 U 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sollte der Endwert innerhalb 30 Sekunden erreicht sein. Durch Zugabe von weiterem NADP^{+} wird die gewünschte NADPH-Konzentration eingestellt. Mit einem Teil dieser Testmischung wird das Fluorimeter geeicht, mit dem anderen der Enzymtest durchgeführt.

b) Bestimmung der Teilaktivitäten

α) Acetyl-Transferase (optischer Test)

Die Bestimmung wird nach der Vorschrift von Weithmann (104) mit den gekoppelten Enzymsystemen Citratsynthetase und Malat-Dehydrogenase durchgeführt.

Die Küvette mit 1 ml Volumen enthält: 200 μMol Tris-HCl, pH 8.1, 10 μMol R,S-Malat, 3 μMol NAD^+ , 0.625 μMol Acetyl-Pantethein, 11 E Malat-Dehydrogenase. Nach Einstellen des Gleichgewichts der Hilfsreaktion werden 4.4 E Citratsynthase und 0.32 μMol Coenzym A zugegeben. Nach einem Blindlauf von ca. 2 Minuten wird mit 6-MSS-Synthetase gestartet.

β) Malonyl-Transferase (optischer Test)

Die Bestimmung folgt der Vorschrift von Weithmann (104). Die Küvette enthält im Volumen 1 ml: 100 μMol Tris-HCl, pH 7.5, 1 μMol Pantethein, 5.4 μMol Acetyl-Phosphat, 200 nMol Malonyl-CoA und 40 E Phosphotransacetylase. Nach Inkubation bei 25° C wird die Reaktion mit 2 bis 5 μg 6-MSS-Synthetase gestartet und die Extinktionsänderung bei 233 nm verfolgt.

γ) Malonyl-Transferase (radioaktiver Test)

Die Bestimmung erfolgt nach Weithmann (104).

Ein verschließbares Zentrifugenglas enthält im Volumen 0.75 ml: 50 μMol K-Phosphat, pH 7.6, 0.2 mg Serumalbumin, 0.06 μMol 2- ^{14}C -Malonyl-CoA (16 000 dpm) und 0.6 μMol Pantethein. Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 15 μg 6-MSS-Synthetase. Nach 5, 10 bzw. 15 Minuten wird die Reaktion mit 50 μl 3 M H_2SO_4 abgestoppt. Im Reaktionsansatz werden 450 mg Ammoniumsulfat gelöst, danach 2- ^{14}C -Malonyl-Pantethein mit 5 ml wassergesättigtem Methyl-Äthyl-Keton extrahiert und 4.25 ml der Oberphase mit 0.8 ml 1 %iger wässriger Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Diese wird mit dreimal 5 ml Scin-

tillationslösung Unisolve I in ein Zahlflaschchen überführt und die Radioaktivität gezählt.

δ) Triacetsäurelaktone-Bildung (optischer Test) (7)

Der Inkubationsansatz enthält 1 ml. Der Test muß mit einem Vier-Küvetten-System durchgeführt werden.

Meßstrahl:

Küvette 1: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6, 100 nMol Acetyl-CoA
500 μ g 6-MSS-Synthetase.

Küvette 2: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6.

Referenzstrahl:

Küvette 3: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6, 500 μ g 6-MSS-Synthetase oder entsprechende Menge Serumalbumin.

Küvette 4: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6, 100 nMol Acetyl-CoA.

Durch gleichzeitige Zugabe von je 200 nMol Malonyl-CoA in die Küvetten 1 und 4 wird nach einem zweiminütigen Blindlauf die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung dann bei 278 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 8\,800 \text{ (litr. Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$.

ε) Triacetsäurelaktone-Bildung (radioaktiver Test)

Die Bestimmung folgt der Vorschrift von Willecke (76).

Der Inkubationsansatz enthält im Volumen 0.5 ml: 50 μ Mol K-Phosphat, pH 7.5, 0.3 μ Mol $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (20 000 dpm), 10 μ Mol Cystein und 0.6 μ Mol Malonyl-CoA. Die Reaktion wird mit 10 μ g 6-MSS-Synthetase gestartet und mit 0.2 ml 10 %iger Perchlorsäure nach verschiedenen Zeiten gestoppt. Das markierte Reaktionsprodukt wird mit 1 ml Triacetsäurelaktone-gesättigtem Äther und 5 mal mit je 1 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verblasen des Äthers wird der Rückstand in 0.1 ml Methanol aufgenommen und auf Kieselgel-Dünnschichtfolie aufgetragen.

Laufmittel: Chloroform:Eisessig = 24 : 1 .

Die Triacetsäurelaktone-Flecken werden quantitativ abgeschabt und in 1 ml Methanol und 10 ml Toluol-Scintillationsflüssigkeit gezählt.

f) β -Ketoacylreduktase

Die Bestimmung folgt der Vorschrift von Seyffert (9).

Die Küvette enthält im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 6.5, 5 μ Mol Triacetylsäureäthylester, 0.8 mg Serumalbumin, 1 mMol EDTA und 400 nMol NADPH. Die Reaktion wird nach 5-minütiger Inkubation und einem zweiminütigen Blindlauf mit 10 bis 50 μ g 6-MSS-Synthetase gestartet und die Extinktionsänderung bei 334 nm verfolgt.

g) Dehydratase

Die Bestimmung erfolgt nach Schmitt (105).

Meß- und Referenzküvette enthalten im Volumen 1 ml: 200 μ Mol Tris-HCl, pH 7.6, 5 μ Mol β -Hydroxyhexanoyl-Pantethein. Nach Inkubation bei 25° C wird die Reaktion in der Meßküvette durch Zugabe von 50 bis 150 μ g 6-MSS-Synthetase gestartet und die Extinktionsänderung bei 263 nm verfolgt.

c) Bestimmung anderer enzymatischer Aktivitäten

α) Fettsäuresynthetase (Hefe)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgt nach Lynen (63).

1 ml enthält: 100 μ Mol K-Phosphat, pH 6.5, 10 μ Mol Cystein, 0.2 mg Serumalbumin, 0.07 μ Mol Acetyl-CoA, 0.2 μ Mol NADPH und 5 bis 10 μ g Enzym. Nach einem Blindlauf von 2 Minuten bei 25° C wird die Reaktion mit 0.1 μ Mol Malonyl-CoA gestartet und die Extinktionsänderung bei 334 nm verfolgt. 1 mE ist die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 2 nMol NADPH pro Minute umsetzt.

β) Fettsäuresynthetase (P.patulum)

Die Aktivität wurde mit dem optischen Standardenzymtest für 6-MSS-Synthetase bestimmt.

γ) 6-MSS-Decarboxylase (P.patulum)

Die Bestimmung erfolgt nach der Vorschrift von Vogel (106). Die Küvette mit 2 ml Volumen enthält: 200 μ Mol K-Phosphat, pH 7.6, 2.5 mg/ml Serumalbumin und 200 nMol 6-MSS. Die Aktivitätsbestimmung wird in einem Fluorimeter durchgeführt. Die Anregung erfolgt bei 310-360 nm, die Fluoreszenzabnahme wird bei 410 nm verfolgt. Vor und nach jeder Meßreihe muß das Fluorimeter mit einer 6-MSS-Standardlösung geeicht werden.

IX. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die 6-Methylsalicylsäure-Synthetase aus *Penicillium patulum* wurde untersucht und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Durch Erweiterung des von Dimroth (6,7) entwickelten submersen Fermentationsverfahrens konnten größere Mengen Mycel mit einheitlich hoher Enzymaktivität und -stabilität gezüchtet werden. Die Stabilität der 6-MSS-Synthetase wurde in Abhängigkeit vom Puffersystem, vom pH-Wert und von der Temperatur untersucht. Die Aktivität der 6-MSS-Synthetase im Rohextrakt ließ sich durch Glycerin und Polyäthylenglykol ausreichend stabilisieren.
2. Die 6-MSS-Synthetase wurde in einem fünfstufigen Isolierungsverfahren 115-fach bis zur Proteineinheitlichkeit angereichert. Die Ausbeute betrug 48 bis 54 %. Es wurden spezifische Aktivitäten zwischen 140 und 165 mE/mg erreicht. Das Enzym verlor in 3 Monaten 30 bis 40 % seiner Aktivität.
3. Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge nach der Sedimentationsgleichgewichtsmethode, durch Zentrifugation im Rohrzuckergradienten nach der Methode von Martin und Ames und durch Gelpermeationschromatographie an Sepharose 6 B bestimmt. Mit diesen Untersuchungsmethoden ergaben sich für das Molekulargewicht der 6-MSS-Synthetase Werte zwischen 740 000 und 820 000.
In der analytischen Ultrazentrifuge wurde das Sedimentationsverhalten der 6-MSS-Synthetase verschiedener Präparationen und in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht.
4. Das Molekulargewicht der Polypeptidketten der 6-MSS-Synthetase wurde durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt. Es wurde nur eine Proteinbande beobachtet, der

ein Molekulargewicht von 176 000 zugeordnet werden kann. Nach Citraconylieren und Carboxymethylieren der 6-MSS-Synthetase war es nicht möglich, elektrophoretisch nicht-identische Untereinheiten nachzuweisen. Der sich daraus ergebende, tetramere Aufbau des Multienzymkomplexes konnte durch Verbrückungsexperimente mit langkettigen Imidoestern bestätigt werden.

Die Ergebnisse können dahingehend gedeutet werden, daß die 6-MSS-Synthetase aus vier identischen, multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaut ist.

5. Es wurde die Thiolreaktivität der 6-MSS-Synthetase gegenüber Thiolhemmstoffen untersucht. Das Enzym wird durch Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid irreversibel gehemmt. Mit Hilfe von Modellreaktionen konnte gezeigt werden, daß von vier untersuchten Teilaktivitäten die Triacetsäurelaktone-Bildung vollständig und die Reduktase partiell gehemmt werden. Eine vorherige Acetylierung des Enzyms mit Acetyl-CoA schützt vor einer Inhibierung durch Jodacetamid. Eine früher beobachtete pH-Unabhängigkeit der Hemmung durch Jodacetamid (6,7) konnte von uns nicht bestätigt werden. Von den 40 Thiolgruppen der 6-MSS-Synthetase kann unter geeigneten Bedingungen und unter gleichzeitigem Verlust der 6-MSS-Synthese-Fähigkeit nur eine einzige carbonylamidomethyliert werden.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Hemmung der 6-MSS-Synthetase durch Patulin, dem Endprodukt des Sekundärstoffwechselweges in *P. patulum*, untersucht.

6. 6-MSS-Synthetase konnte durch vierstündiges Inkubieren bei 0° C in einer 2 M LiCl-Lösung reversibel gespalten werden. Dabei ging die Gesamtaktivität vollständig und die Fähigkeit zur Triacetsäurelaktone-Bildung teilweise verloren. Die anderen Teilaktivitäten (Acetyl-Transferase, Malonyl-Transferase und Reduktase) blieben weitgehend erhalten.

Unter geeigneten Bedingungen konnten bis zu 70 % der ursprünglich vorhandenen Aktivität zurückgewonnen werden. Es wurde das Sedimentationsverhalten der Spaltstücke untersucht.

7. Gegen 6-MSS-Synthetase wurden aus Kaninchenserum spezifische Antikörper gewonnen. Die Untersuchungen mit Anti-6-MSS-Synthetase ergaben:
 - a) Anti 6-MSS-Synthetase reagiert nur mit 6-MSS-Synthetase und mit FS-Synthetase aus *P. patulum*, nicht aber mit Hefe-FS-Synthetase. Damit können die beiden Synthetasen aus *P. patulum* als phylogenetisch nahe verwandte Proteine angesehen werden.
 - b) Anti-6-MSS-Synthetase hemmt die Gesamtaktivität vollständig. Von den untersuchten Teilaktivitäten wurden die Acetyl- und die Malonyl-Transferasen durch Anti-6-MSS-Synthetase nicht beeinflusst. Die kondensierende Teilaktivität (Triacetsäurelaktone-Bildung) wurde gleichermaßen wie die Gesamtaktivität gehemmt. Bei der Reduktase wurde nur eine partielle Inhibierung beobachtet. Die Auswertung der Hemmkinetik ergab eine nicht-kompetitive Hemmung der Reduktase durch Anti-6-MSS-Synthetase.
8. Die Untersuchung der von Vogel (30) beschriebenen, fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung der 6-MSS-Synthetase ergaben, daß ausreichende Mengen Serumalbumin die Fluoreszenz der 6-Methylsalicylsäure etwa 80-fach verstärken, wohingegen NADPH eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung verursacht, die unter Testbedingungen 65 % beträgt. Um die NADPH-Konzentration während der Aktivitätsbestimmung konstant halten zu können, wurde die Einführung eines NADPH-regenerierenden Enzymsystems vorgeschlagen.

9. Untersucht wurde der Einfluß der Substrate auf die Aktivität der 6-MSS-Synthetase. Die Inkubation des Enzyms mit einem der Substrate hatte keinen Einfluß auf die Aktivität. Die Gegenwart von Acetyl-CoA u n d Malonyl-CoA verursachte eine etwa 50 %ige Inaktivierung der 6-MSS-Synthetase.
10. Die 6-MSS-Synthetase katalysiert die Wasserabspaltung aus β -Hydroxy-hexanoyl-pantethein. Dieses Modellsubstrat kann zur Bestimmung der Dehydratase-Teilaktivität eingesetzt werden. Es wird die Existenz einer weiteren Teilaktivität, der Hexenoyl-pantethein-Isomerase diskutiert.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. BU'LOCK, J.D. und RYAN, A.J. (1958) *Proc.Chem.Soc.* 222.
2. BU'LOCK, J.D., HAMILTON, D., HULME, M.S., POWELL, A.J., SHEPERD, D. und SMITH, G.M. (1965) *Can.J.Microbiol.* 11, 765.
3. COLLIE, J.N. (1907) *J.Chem.Soc.* 91, 1806.
4. BIRCH, A.J. und DONOVAN, F.W. (1953) *Austr.J.Chem.* 6, 360.
5. LYNEN, F. und TADA, M. (1961) *Angew. Chem.* 73, 513.
6. DIMROTH, P. (1968) *Diss. Univ. München*.
7. DIMROTH, P., WALTER, H. und LYNEN, F. (1970) *Eur.J.Biochem.* 13, 98.
8. GREULL, G. (1973) *Diss. Univ. München*
9. SEYFFERT, R. unveröffentlichte Versuche.
10. DIMROTH, P., RINGELMANN, E. und LYNEN, F. (1976) *Eur.J. Biochem.* 68, 591.
11. SCHINDLBECK, W. (1974) *Diss. Univ. München*
12. FELDMANN, K., ZEISEL, H.J. und HELMREICH, E.J.M. (1976) *Eur.J.Biochem.*
13. LILL, U.I., BEHRENDT und HARTMANN, G.R. (1975) *Eur.J. Biochem.* 52, 411.
14. DIMROTH, P., BUCKEL, W., LOYAL, R. und EGGERER, H. (1977) *Eur.J.Biochem.* (in press).
15. SCHWEIZER, E., KÜHN, L. und CASTORPH, H. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem.* 352, 377.
16. KÜHN, L., CASTORPH, H. und SCHWEIZER, E. (1972) *Eur.J. Biochem.* 24, 492.
17. BURKL, G., CASTORPH, H. und SCHWEIZER, E. (1972) *Molec. gen.Genet.* 119, 315.
18. SCHWEIZER, E., HOLZNER, U., MEYER, K.-H., TAURO, P. und SCHWEIZER, M. (1974) in: *Comparative Biochemistry and Physiology of Transport* (BOLLIS, L., BLOCH, K., LURIA, S.E., und LYNEN, F. eds.) S. 219, North-Holland Publ.Comp.Amsterdam.
19. SCHWEIZER, E. (1973) *Angew.Chemie* 85, 365.
20. TAURO, P., HOLZNER, U., CASTORPH, H., HILL, F. und SCHWEIZER, E. (1974) *Mol.gen.Genet.* 129, 131.
21. SCHWEIZER, E. (1974) *Abstr.Communi. 9th FEBS Meeting Budapest*, S. 30.
22. SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H. und HOLZNER, U. (1973) *Eur.J.Biochem.* 39, 353.
23. SCHWEIZER, E., DIETLEIN, G., GIMMLER, G., KNOBLING, A., TAHEDL, H.W., SCHWIETZ, H. und SCHWEIZER, H. (1975) in: *Proc. 10th FEBS Meeting Paris, Vol.40* (DESNUELLES, P. and MICHELSON, A.M. eds.), S. 25-34, North-Holland Publ.Comp.Amsterdam.

24. LYNEN, F. (1970) in: Miami Winter Symposia 1, S 151, North-Holland Publ.Comp.Amsterdam.
25. LYNEN, F. (1972) in: Current Trends in the Biochemistry of Lipids, S. 5, Acad.Press, London und N.Y.
26. VOLPE, J.J. und VAGELOS, P.R. (1973) Ann.Rev;Biochem. 21
27. GUCHHAIT, R.B., POLAKIS, S.E., DIMROTH, P., STOLL, E., MOSS, J. und LANE, M.D. (1974) J.Biol.Chem. 249, 6633.
28. ALBERTS, A.W. und VAGELOS, P.R. (1972) in: The Enzymes, 3 rd ed. 6, 37, P.D. BOYER, ed., Academic Press, N.Y.
29. SPIESS, J. (1976) Diss. Univ. München.
30. VOGEL, G. und LYNEN, F. (1976) Meth.Enz. 43, 520.
31. VOGEL, G., persönl. Mitteilung
32. MANDELSTAM, J. (1960) Bacteriol. Rev. 24, 289.
33. LIGHT, R.J. (1967) J.Biol.Chem. 242, 1880.
34. LIGHT, R.J. und HAGER, L.P. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 125, 326.
35. JUCKES, I.R.M. (1971) Biochim.Biophys.Acta 229, 535.
36. FORSTER, P.R., DUNNILL, P. und LILLY, M.D. (1973) Biochim.Biophys.Acta 317, 505.
37. Handbook of Biochemistry, Ed. SORBER, H.A. und HARTE, R.A. 2nd ed. (1971), Cleveland, Ohio, Chemical Rubber.
38. MARTIN, R.G. und AMES, B.N. (1961) J.Biol.Chem. 236, 1372.
39. YPHANTIS, D.A. (1964) Biochemistry 3, 297.
40. CASSMAN, M. und SCHACHMANN, H.K. (1971) Biochemistry 10, 1015.
41. WIELAND, Th., DUESBERG, P. und DETERMANN, H. (1963) Biochem.Z. 337, 303.
42. WHITAKER, J.R. (1963) Anal.Chem. 35, 1950.
43. ANDREWS, P. (1964) Biochem.J. 91, 222.
44. Blue dextran 2000, Firmenschrift Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.
45. SUND, H., WEBER, K. und MÖLBERT, E. (1967) Eur.J.Biochem. 1, 400.
46. LYNEN, F. (1962) Proc.Robert A. Welch Found.Conf.Chem.Res. No 5, Houston, Texas, p. 293.
47. REYNOLDS, J.A. und TANFORD, C. (1970) Proc.Nat.Acad.Sci. 66, 1002.
48. PITT-RIVERS, R. und IMPIOBATO, F.S.A. (1968) Biochem.J. 109, 825.
49. WEBER, K. und OSBORN, M. (1969) J.Biol.Chem. 244, 4406.
50. ZILLIG, W. persönl. Mitteilung.
51. LAEMMLI, U.K. (1970), Nature 227, 680.

52. ENGESER, H.-J., WIELAND, F. und LYNEN, F. (1977) FEBS Letters (in press).
53. SCHRAMM, H.J. und DÜLFFER, T. (1976) Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 357, 477.
54. LANGER, R., POPPE, Ch., SCHRAMM, H.J. und HOPPE, W. (1975) J.Mol.Biol. 93, 159.
55. FERGUSON, K.A. (1964) Metabolism 13, 985.
56. HEDRICK, J.L. und SMITH, A.J. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 126, 155.
57. SUMPER, M. (1970) Diss. Univ. München.
58. ENGESER, H.-J. (1974) Diplomarbeit, Univ. München.
59. ELLMAN, G.L. (1958) Arch.Biochem.Biophys. 74, 443.
60. ZIEGENHORN, J. (1970) Diss. Univ. München.
61. BREW, K. und CAMPBELL, M. (1967) Biochem.J. 102, 258.
62. FRAENKEL-CONRAT, H. (1956) Ann.Rev.Biochem. 25, 291.
63. LYNEN, F., HOPPER-KESSEL, I. und EGGERER, H. (1964) Biochem.Z. 340, 95.
64. OESTERHELT, D. (1967) Diss. Univ. München.
65. KRESZE, G.-B. (1976) Diss. Univ. München.
66. KRIMSKY, I. und RACKER, E. (1955) Science 122, 319.
67. REED, L.J. (1960) in: The Enzymes (BOYER, P.D., LARDY, H. und MYRBÄCK, K. eds.), 2nd ed., Vol. 3, S. 195, Academic Press N.Y.
68. LIPMANN, F., GEVERS, W., KLEINKAUF, H. und ROSKOSKI jr., R. (1971) Adv. Enzymol. 35, 1.
69. GERHART, J.C. und SCHACHMAN, H.K. (1968) Biochemistry 7, 538.
70. HOLTERMÜLLER, K.H., RINGELMANN, E. und LYNEN, F. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1411.
71. CRAMPTON, M.R. (1974) in: The chemistry of thiol-group (PATAI, S. ed.), S. 400, John Wiley and Sons, London.
72. VOGEL, G. (1971) Diss. Univ. München
73. MURPHY, G., VOGEL, G., KRIPPAHL, G. und LYNEN, F. (1974) Eur.J.Biochem. 49, 443.
74. ASHOOR, S.H. und CHU, F.S. (1973) Fd.Cosmet.Toxicol. Vol. II, S. 617.
75. ASHOOR, S.H. und CHU, F.S. (1973) Fd.Cosmet.Toxicol. Vol. II, S. 995.
76. WILLECKE, K. (1968) Diss. Univ. München.
77. HAGEN, A. (1963) Diss. Univ. München.
78. SCHIELE, U. und STÜRZER, M. (1975) Eur.J.Biochem. 60, 267.
79. DIEZEL, W., NISSLER, K., HEILMANN, W., KOPPERSCHLÄGER, G. und HOFMAN, E. (1972) FEBS Letters 27, 195.

80. JUNI, E. und HEYM, G.A. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 127, 89.
81. HESS, S. (1977) Diss. Univ. München.
82. HEIL, A. und ZILLIG, W. (1970) FEBS Letters 11, 105.
83. FÖRSTER, T. (1951) "Fluoreszenz organischer Verbindungen" Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen.
84. KASS, L.R., BROCK, D.J.H. und BLOCH, K. (1967) J.Biol.Chem. 242, 4418.
85. BROCK, D.J.H., KASS, L.R. und BLOCH, K. (1967) J.Biol.Chem. 242, 4432.
86. SIMON, E.J. und SHEMIN D. (1953) J.Amer.chem.Soc. 75, 2520.
87. EGGERER, H. und LYNEN, F. (1962) Biochem.Z. 335, 540.
88. YPHANTIS, D.A. (1964) Biochem. 3, 297.
89. HARRIS, C.M. und HARRIS, T.M. (1971) J.Org. Chem. 36, 2181.
90. LYNEN, F. (1901) Liebigs Ann.d.Chem. 574, 33.
91. ELIEL, E.L., RIVARD, E.D. und BURGSTHALER, A.W. (1953) J. Org. Chem. 18, 1679.
92. COLLIE, N.J. (1891) J.Chem.Soc. 59, 609.
93. STADTMAN, E.R. (1953) J.cell.comparat.Physiol. 41, 89.
94. DECKER, K. (1974) in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H.U. ed.), 3. Aufl., S. 2037, Verlag Chemie Weinheim.
95. MICHAL, G. und BERGMAYER, H.U. in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H.U. ed.), 3. Aufl., S 2020, Verlag Chemie Weinheim.
96. BEISENHERZ, G. BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., CZOD, R., BARBADE, K.H., MEYER-AHRENDT, E. und PFLEIDERER, G. (1953) Z.f.Naturf. 8b, 555.
97. WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. (1942) Biochem.Z. 310, 384.
98. MERKENSCHLAGER, M., SCHLOSSMANN, K. und KURZ, W. (1957) Biochem.Z. 329, 332.
99. RHIGETTI, P., DRYSDALE, J.W. (1971) Biochim.Biophys.Acta 236, 17.
100. MAURER, H.R. (1968) Diskelektrophorese, Walter de Gruyter Verlag, Berlin.
101. SCHRAMM, H.J., persönl. Mitteilung.
102. OUCHTERLONY, Q., (1949) Arkiv Kemi 1, 43.
103. SCHEIDEgger, J.J. (1955) Int.Arch.Allergy 7, 103.
104. WEITHMANN, U. (1974) Diss. Univ. München.
105. SCHMITT, Th. (1977) Diplomarbeit Univ. München.
106. VOGEL, G. und LIGHT, R.J. (1976) Meth.Enz. 43, 520..
107. Affinity Chromatography, Principles and Methods, (1975) Firmenschrift Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Lebenslauf

geboren am 12. Juni 1945 in Waldshut

Eltern: Herbert Friedrich, Verwaltungsangestellter
Cäcilia Friedrich, geb. Holzscheiter

Heirat: 1969 mit Monika Friedrich, geb. Weis,
Sonderschullehrerin

1952 - 1957 Volksschule Bruchsal/Bad.-Württ.

1957 - 1959 Privatgymnasium, Bruchsal

1959 - 1966 Schönborn-Gymnasium, Bruchsal

1966 - 1968 Wehrdienst

1968 - 1973 Studium der Chemie und Biologie für höheres
Lehramt an der Universität Freiburg i. Br.

1972 Staatsexamen in Chemie und Biologie

1973 Staatsexamensarbeit unter Anleitung von
Professor Dr. K. Wallenfels am Chemischen
Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.
über das Thema "Untersuchungen über proteo-
lytische Enzyme aus Pseudomonas fluoreszenz".

1974 - 1977 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der
Universität München und am Max-Planck-Insti-
tut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung
von Professor Dr. F. Lynen.

